

**Charakterisierung und Modifizierung poröser Cellulosepartikel  
für die flüssige Hochleistungs-Chromatographie und ihr Einsatz  
zur Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Christoph Wieland

geboren am 13.12.1974 in Wertingen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Panne

2. Prof. Dr. Klaus Rademann

3. Prof. Dr. Andreas Thünemann

Datum der mündlichen Prüfung: 07.12.2009

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Thünemann für die interessante Themenstellung und seine stets gewährte Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Panne bedanke ich mich für die Realisierung dieser Arbeit und sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Bei Herrn Prof. André Laschewsky möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe „Wasserbasierende Polymersysteme“ des IAP durchzuführen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefano Bruzzano danken, der mir stets mit wissenschaftlichem Rat und Tat zur Seite stand und mir stets behilflich bei der Lösung von Problemen war.

Ein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Peter Klobes, Herrn Carsten Prinz und Frau Annett Zimathies für ihre tatkräftige Hilfe bei den Porosimetrie-Untersuchungen.

Herrn Friedmar Delissen danke ich für seine Hilfe bei den SAXS-Messungen.

Frau Anka Kohl danke ich für die große Hilfe bei den IR-Untersuchungen.

Herrn Dr. Bohrisch danke ich für das Korrekturlesen und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung I der BAM sowie des IAP, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau Franziska für die jahrelange Unterstützung.

## Abstract

Perlcellulose stellt ein interessantes Material für den Einsatz in der wässrigen Größenausschlusschromatographie (SEC) dar. Sie ist aufgrund ihrer guten Modifizierbarkeit zudem ein perfektes Ausgangsmaterial für Protein-Aggregationsuntersuchungen. Ein Protein von besonderem praktischem Interesse ist Insulin. Dessen Fehlfaltung und Aggregation verursacht eine Reihe von schwerwiegenden Problemen (z.B. in Drug-Delivery-Systemen). Hierbei erfolgt eine Umwandlung von  $\alpha$ -Helix- in  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen wobei sich unlösliche Fibrillen bilden. Deren Rückfaltung mit Hilfe fluorierter Alkohole sowie mit fluorierten Nanopartikeln wurde in der Literatur beschrieben. Der Ansatzpunkt dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Fluor auf Oberflächen mit hohem Anteil von Hydroxylgruppen eine Rückfaltung von Proteinen wie Insulin bewirken kann. Das Ziel war es, schaltbare stationäre Phasen zu erhalten, mit denen sowohl eine Rückfaltung als auch die Trennung von Proteinen durchgeführt werden können.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung geeigneter Perlcellulosen, wobei erstmals eine Kombination der „klassischen“ Porosimetrie (Hg-Intrusion,  $N_2$ -Sorption) mit SAXS und Inverser SEC zur Untersuchung der Porenstruktur von Cellulose angewandt wurde. Es konnte die reversible Schrumpfung der Poren während der Trocknungsprozesse beschrieben werden. Die Immobilisierung von Fluor auf der Oberfläche von Cellulosepartikeln erfolgte u.a. durch Pfropfung von fluorierten Acrylaten mittels  $Ce(IV)$ -Redoxinitiierung. Es gelang eine homopolymerfreie Pfropfung, wobei es zu keiner Veränderung der Porenstruktur kam. Die Kontrolle der Proteinadsorption auf der modifizierten Oberfläche mittels chemischer Stimuli konnte beschrieben werden. Aggregationsuntersuchungen mittels SEC, DLS und SAXS ergaben, dass fluormodifizierte Perlcellulose keine Verzögerung der Insulinaggregation bewirkt. Jedoch zeigte sich, dass unmodifizierte Perlcellulose eine signifikante Verzögerung der Aggregation bewirken kann.

## Schlagworte:

Flüssigchromatographie, Gelpermeationschromatographie, (Perl-)Cellulose, Pfropfcopolymerisation, Porosimetrie, Röntgenkleinwinkelstreuung, Proteinaggregation, Insulin

---

## Abstract (English)

Porous bead cellulose is an interesting material for the application in aqueous size exclusion chromatography (SEC). Its good modifiability makes it furthermore to a perfect starting material for protein aggregation studies. A protein with huge practical importance is insulin. Misfolding and aggregation of insulin creates serious problems e.g. in drug delivery systems. Thereby it undergoes a change from  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet structure and forms insoluble fibrils. A back-folding with (toxic) fluorinated alcohols and fluorinated nanoparticles was already shown in literature. The approach for this work was that fluorine ( $\text{CF}_3$ ) on a surface with high hydroxyl-content can induce the back folding of proteins like insulin. The purpose was to get stationary phases that can induce back folding and separation of proteins on a single column. At first a characterization of suitable cellulose beads with focus on different porosimetry methods was done. For the first time a combination of “classical” porosimetry methods (Hg-Intrusion;  $\text{N}_2$ -Sorption) with SAXS and inverse SEC was applied for porous cellulose particles. A reversible shrinking of pores during drying process was shown. Immobilization of fluorine on the surface of cellulose beads was done by grafting of fluorinated acrylates via cer(IV)-redox-initiation and by polymer analogous reaction with fluorinated iodo alkanes. Homopolymer free graft-copolymerization was achieved, whereas no effect on pore structure was observed. The control of protein adsorption on surface by chemical stimuli was shown. Aggregation studies using SEC, DLS and SAXS showed that fluoro-modified cellulose beads do not delay insulin-aggregation due to strong adsorption effects. Though a significant aggregation delay for insulin with unmodified cellulose beads was discovered.

### Keywords:

Liquid chromatography, Size exclusion chromatography, cellulose (-beads), graft co-polymerization, porosimetry, X-ray small angle scattering, protein aggregation, insulin

# Inhalt

<i>1</i>	<i>Einleitung</i> .....	<i>1</i>
<i>2</i>	<i>Zielsetzung</i> .....	<i>3</i>
<i>3</i>	<i>Theoretische Grundlagen</i> .....	<i>4</i>
3.1	<i>Proteine und Peptide</i> .....	4
3.1.1	Eigenschaften von Proteinen und Peptiden .....	4
3.1.2	Aggregation von Proteinen und Peptiden .....	5
3.1.3	Insulin .....	7
3.2	<i>Perlcellulose</i> .....	11
3.2.1	Herstellungsmethoden .....	11
3.2.2	Eigenschaften und Anwendungen .....	12
3.2.3	Modifizierung von Cellulose .....	13
3.3	<i>Analytische Methoden</i> .....	16
3.3.1	Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	16
3.3.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	20
3.3.3	Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) .....	21
3.4	<i>Porosimetrie</i> .....	22
3.4.1	Quecksilberporosimetrie .....	22
3.4.2	Gasadsorptionsmessungen .....	23
3.4.3	Inverse Größenausschlusschromatographie (ISEC) .....	25
3.4.4	Röntgenkleinwinkelstreuung an porösen Systemen .....	27
<i>4</i>	<i>Ergebnisse und Diskussion</i> .....	<i>30</i>
4.1	<i>Auswahl der eingesetzten Materialien</i> .....	30
4.1.1	Perlcellulose .....	30
4.1.2	Referenzmaterialien für die Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	30
4.2	<i>Charakterisierung der Perlcellulosen</i> .....	34
4.2.1	Trocknung der Perlcellulose .....	34
4.2.2	Lichtmikroskopie .....	34
4.2.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	36
4.2.4	Quecksilberporosimetrie und Gasadsorptionsmessungen .....	37
4.2.5	Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	43
4.2.6	Inverse Größenausschlusschromatographie (ISEC) .....	47
4.2.7	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) .....	52
4.2.8	Zusammenfassung der Partikelcharakterisierung .....	57

4.3	<i>Modifizierung von Perlcellulose</i> .....	59
4.3.1	Pfropfcopolymerisation der Perlcellulose .....	59
4.3.2	Polymeranalogue Umsetzung.....	60
4.3.3	Charakterisierung von modifizierten Perlcellulose-Proben.....	62
4.4	<i>Anwendungsuntersuchungen an modifizierten Perlcellulosen</i> .....	69
4.4.1	Adsorptionsuntersuchungen mit Proteinen .....	69
4.4.2	Aggregationsuntersuchungen mit Insulinlösungen .....	74
4.4.3	Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) an aggregierten Insulinproben .....	86
5	<i>Zusammenfassung</i> .....	93
6	<i>Experimenteller Teil</i> .....	96
6.1	<i>Materialien</i> .....	96
6.2	<i>Trocknung der Perlcellulose</i> .....	96
6.3	<i>Herstellung der Pufferlösungen</i> .....	97
6.4	<i>Synthesen</i> .....	98
6.4.1	Homopolymerisation von fluorierten Acrylaten .....	98
6.4.2	Modifizierung von Perlcellulose mittels Cer(IV)-initiiertter Pfropfcopolymerisation .....	98
6.4.3	Polymeranalogue Umsetzung von Perlcellulose mit 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-5-iod-pentan .....	99
6.5	<i>Aggregationsuntersuchungen</i> .....	100
6.6	<i>Übersicht über die analytischen Methoden</i> .....	101
6.6.1	Lichtmikroskopie .....	101
6.6.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	101
6.6.3	Helium-Pyknometrie .....	101
6.6.4	Quecksilberporosimetrie .....	101
6.6.5	Gasadsorptionsmessungen .....	102
6.6.6	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	102
6.6.7	IR-Spektroskopie .....	103
6.6.8	Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (XPS) .....	104
6.6.9	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	104
6.6.10	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	105
7	<i>Literatur</i> .....	106

## Symbole und Abkürzungen

AGU	Anhydroglucoseeinheit (engl. <i>anhydroglucose unit</i> )
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i> )
$dn/dc$	Brechungsindexinkrement ( $\text{ml g}^{-1}$ )
EA	Elementaranalyse
HAc	Essigsäure
HFP	1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-5-iod-pentan
ISEC	Inverse Größenausschlusschromatographie
IU	International Unit (deutsch: IE; d.h. Internationale Einheit); Synonym: USP Unit
$K$	Verteilungskoeffizient der SEC ( $0 \leq K \leq 1$ )
$l_z$	Länge der Insulinfibrillen
$\lambda$	Wellenlänge
M	molar (d.h. Mol pro Liter)
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering
MT50	Perlc ellulose Perloca MT50 von Iontosorb
MT100	Perlc ellulose Perloca MT100 von Iontosorb
$[\eta]$	intrinsische Viskosität (auch Grenzviskosität) in $\text{ml g}^{-1}$
$PD$	Polydisperistätsindex ( $= M_w/M_n$ )
pI	Isoelektrischer Punkt
PPFPMA	Poly(3,3,3,2,2-Pentafluorpropylmethacrylat)
PTFEMA	Poly(2,2,2-Trifluorethylmethacrylat)
$q$	Streuvektor
$R$	Porenradius
$r_g$	Trägheitsradius (auch Gyrationradius; engl.: <i>radius of gyration</i> )
$r_\eta$	Viskositätsradius (auch Einstein-Radius)
$r_s$	Stokes-Radius
RT	Raumtemperatur
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. <i>small angle X-ray scattering</i> )
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i> )
$t_{50\%}$	Halbwertszeit der Insulinaggregation
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
$V_e$	Elutionsvolumen
$w$	synthetischer Massenanteil
XPS	Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (engl. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> )





# 1 Einleitung

Die Entwicklung diagnostischer Verfahren unter Verwendung maßgeschneiderter Polymermaterialien eröffnet neue Lösungsvarianten für die Bearbeitung biomedizinischer Fragestellungen. Ein Schwerpunkt solcher Materialentwicklungen ist die Herstellung von polymeren Trenn- und Trägermaterialien, z. B. von multifunktionalen Biochips oder von chromatographischen Phasen für Proteine. Die chromatographische (Auf-)Trennung von Biomolekülen, speziell von Proteinen wie dem Insulin ist ein aktuelles Gebiet, da diese Methode sowohl für die Produktanalytik als auch großtechnisch als Downstream-Prozess in biotechnologischen und pharmazeutischen Produktionsverfahren genutzt wird. Die meisten Trennverfahren, so z. B. die Reversed-Phase-Chromatographie oder Affinitätschromatographie, nutzen Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und dem Analyten als Trennprinzip. Dadurch ist eine Trennung allein nach der Molekülgröße hier nicht möglich. Die Molekülgröße ist jedoch ein wesentlicher Parameter, da die Aktivität von Biomolekülen, speziell von Enzymen und Hormonen, maßgeblich von ihr abhängt. Ein hierfür funktionierendes Trennprinzip stellt die Trennung nach der hydrodynamischen Größe der Analyten dar. Um in der Größenausschlusschromatographie SEC (engl. *size exclusion chromatography*) molare Massen zu bestimmen, ist daher eine Überlagerung des Trennkriteriums Größe durch andere Wechselwirkungen zu vermeiden. Normalerweise wird dies durch Zusätze zum Laufmittel erreicht, wodurch sich meist die Lösungszustände der Analyten verändern – Proteine denaturieren teilweise, d.h. die in biologischer Umgebung vorliegenden räumliche Strukturen (Knäuel,  $\alpha$ -Helices, Dimere, Monomere, Komplexe etc.) werden nicht mehr erfasst.

Für eine solche Analyse benötigt man daher SEC-Phasen, die unter weitgehend physiologischen Bedingungen einsetzbar sind. Gleichzeitig müssen dabei die weiteren wesentlichen Partikeleigenschaften – wie enge Partikelgrößenverteilung mit Maxima zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$ , hohe Porositäten mit Porengrößen im Bereich 3 bis 1000 nm – optimal eingestellt werden. Hierfür werden bereits eine Reihe kommerzieller Trennphasen auf Basis von vernetzten Dextranen, Agarosen, Polyacrylamiden sowie Komposite aus diesen Verbindungen angeboten. Diese Gel-Materialien sind jedoch nicht sehr druckstabil. Um das Gelbett nicht zu schädigen, muss der Druck in den Trennsäulen möglichst niedrig gehalten werden. Dies bedingt wiederum in der Praxis niedrige Flussraten und somit längere Analysezeiten. Eine geringe Druckstabilität der Trennphase wirkt sich ebenso nachteilig auf deren Haltbarkeit aus. Perlförmige Cellulosen stellen gute Basismaterialien für die Entwicklung neuer druckstabiler Trägermaterialien dar. Für die Gewinnung partikulärer Cellulosen ist eine Reihe von Verfahren

bekannt [1], mit denen entscheidende Parameter wie Partikel- und Porengröße über einen großen Bereich gezielt eingestellt werden können. Perlcellulosen weisen eine große Hydrophilie, eine hohe Porosität und große innere Oberfläche auf. Hinzu kommen eine gute mechanische Festigkeit, chemische Stabilität sowie vielfältige Funktionalisierbarkeit. In der Vergangenheit wurde berichtet, dass Cellulosepartikel sowohl in Form von reinen Perlcellulosen sowie nach chemischer Modifizierung als stationäre Phase für chromatographische Trennungen geeignet sind [2]. SEC-Untersuchungen mit Perlcellulosen zeigten gute Trenneffekte in Abhängigkeit von der Porosität und Vernetzung für Dextrane als Modellverbindungen [3]. Weiterhin ist bekannt, dass die Ionenaustauschfähigkeit von modifizierten Perlcellulosen prinzipiell auch zur Trennung von Proteinen eingesetzt werden kann [4]. Die wesentlichen bekannten Anwendungen von Cellulosepartikeln in der Chromatographie nutzen – analog dem Einsatz herkömmlicher Trennphasen – die Wechselwirkungen zwischen zu trennenden Analyten und dem cellulosischen Säulenmaterial [2,5,6]. Das wird nicht nur bei einer Reihe von analytischen Fragestellungen, sondern auch in präparativen Trennungen wie z.B. der Blutwäsche bereits genutzt.

Als Hypothese dieser Arbeit wird angenommen, dass – neben dem Einsatz in der SEC – modifizierte Perlcellulosen zur Umwandlung unerwünschter Protein-Aggregate genutzt werden können. Protein-Aggregate können – wie zum Beispiel im Falle des Insulins – die Herstellung, Lagerung und Applikation von Medikamenten negativ beeinflussen. Auch spielt die Protein-Aggregation bei der Entstehung eine Reihe degenerativer Krankheiten, z.B. Alzheimer- oder Parkinson-Demenz, eine entscheidende Rolle. Wie eine Reihe von Arbeiten gezeigt hat [7,8,9,10], kann man durch die Zugabe von fluorierten Alkoholen in wässrigen Medien eine Auflösung von aggregierten Peptiden und Proteinen erzielen. Fluorierte Alkohole sind jedoch in der Regel toxisch – sie lassen sich demzufolge nicht für „*in vivo*“ - Systeme einsetzen, auch müssen diese nach der Anwendung aufwändig abgetrennt werden. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Biokompatibilität ist nun die Fixierung von  $\text{CF}_3$ -Gruppen auf der Oberfläche geeigneter Partikel. Diese Methode wurde bereits für fluoridierte Nanopartikel (Polyelektrolyt-Fluortensid-Komplexe) beschrieben [11], kann aber prinzipiell auf Perlcellulosen übertragen werden. Hierzu müssen jedoch Bedingungen gefunden werden, mit denen aufgrund äußerer Stimuli die Wechselwirkungen von Substrat und Analyt gezielt gesteuert werden können, so dass die modifizierten Perlcellulosen als schaltbare Materialien sowohl für eine Affinitäts- wie auch Größenausschlusschromatographie genutzt werden können.

## 2 Zielsetzung

Eine wechselwirkungsfreie Trennung von Protein-Gemischen mit Cellulosepartikeln wird bisher nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb geeignete Ausgangsmaterialien auf Basis von Perlcellulosen für den Einsatz in der SEC von Proteinen untersucht und charakterisiert werden. Hier soll vor allem die Porenstruktur umfassend untersucht werden. Es ist ein bekanntes Problem, dass verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Porensystemen oft sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dies gilt besonders bei quellbaren Materialien wie Cellulose mit deutlichen Unterschieden zwischen trockenem und feuchtem Zustand. Mit verschiedenen Methoden (Hg-Porosimetrie, Stickstoffsorption, Inverse Größenausschlusschromatographie ISEC, Röntgen-Kleinwinkelstreuung SAXS) sollen sowohl die gequollenen als auch getrocknete Celluloseperlen untersucht werden, so dass Aussagen getroffen werden können, welche für diese Produkte am besten geeignet ist. SEC-Untersuchungen mit Polysaccharid- und Protein-Referenzanalyten sollen anschließend zeigen ob es erforderlich ist, Oberflächeneigenschaften der Perlcellulosen durch chemische Funktionalisierung so zu justieren, dass sich Wechselwirkungen mit den zu trennenden Proteinen quantitativ vermeiden lassen.

Durch chemische (Oberflächen-)Modifizierung ausgewählter Perlcellulosen sollen vorzugsweise partikuläre Trennphasen erhalten werden, deren Adsorptions- bzw. Desorptionsvermögen für Proteine durch physikalisch-chemische Stimuli (pH-Wert, Salzgehalt in Lösung etc.) gesteuert werden. Proteine sollen hiermit aus einer komplexen Probenmatrix abgetrennt werden, so dass sich derartig schaltbare Materialien in der SEC-Analyse von Proteinen zur Probenvorbereitung bzw. Festphasenextraktion der Analyten nutzen lassen. Dies soll durch Funktionalisierung (radikalische Pfropfung, polymeranaloge Umsetzung) des Substrates mit Hilfe reaktiver Fluorverbindungen erfolgen. Anschließend erfolgt die chemische Analyse und Partikelcharakterisierung der Syntheseprodukte.

Schließlich sollen Anwendungsuntersuchungen mit der modifizierten Perlcellulose hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit Proteinen in wässriger Lösung durchgeführt werden. Hierzu sollen Untersuchungen zur Quantifizierung des Einflusses unterschiedlich modifizierter Cellulosepartikel auf Wechselwirkungen mit ausgesuchten Proteinen erfolgen. Insbesondere soll die Aggregation von Insulin unter Variation physikalisch-chemischer Parameter (pH, Salzgehalt, Temperatur) in Lösung untersucht werden.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 *Proteine und Peptide*

Sowohl Peptide als auch Proteine – umgangssprachlich auch als Eiweiße bezeichnet – sind Kettenmoleküle, die komplett oder zum größten Teil aus Aminosäuren aufgebaut sind [12]. Insgesamt kommen im menschlichen Körper 21 verschiedene Aminosäuren vor. Die Bildung von Peptiden und Proteinen geschieht in der Natur vor allem durch die so genannte Proteinbiosynthese. Eine Unterscheidung erfolgt dabei in erster Linie auf Grund der Anzahl an Monomer-Einheiten: Bei bis zu 100 Aminosäuren – dies entspricht einer Molmasse von ca.  $10 - 12\,000\text{ g mol}^{-1}$  – spricht man in der Regel von Peptiden, größere Moleküle werden als Proteine bezeichnet.

Proteine machen den größten Teil der organischen Verbindungen in lebenden Zellen aus. Im menschlichen Körper finden sich schätzungsweise 100 000 unterschiedliche Proteine. Diese können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die globulären Proteine besitzen eine annähernd kugelförmige Tertiär- bzw. Quartärstruktur und sind in der Regel gut wasserlöslich (z. B. Albumin). Fibrilläre Proteine hingegen sind in Wasser und Salzlösungen praktisch unlösliche Faserproteine. Die einzelnen Polypeptidketten sind dabei parallel angeordnet und zählen zu den Gerüst- und Stützsubstanzen. Wichtige Vertreter sind u. a. die Kollagene und Keratine. Bei den Peptiden spielen die Peptidhormone wiederum eine herausragende Rolle.

##### 3.1.1 *Eigenschaften von Proteinen und Peptiden*

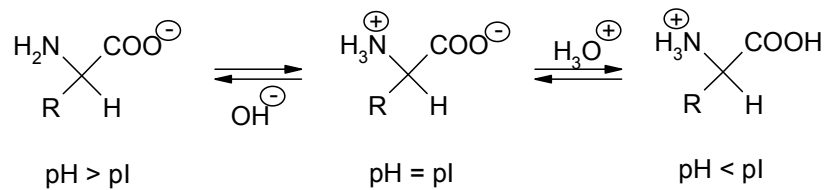
Vom chemischen Aufbau her können sowohl Proteine als auch Peptide zu den Polyamiden gezählt werden. Die CO-NH-Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren wird dabei als Peptidbindung bezeichnet. Der Bindungsabstand von C- und N-Atom mit 0.133 nm liegt unter einer normalen Einfachbindung (0.147 nm) und weist einen partiellen Doppelbindungscharakter auf.

Auf Grund der Tatsache, dass Proteine und Peptide aus Aminosäuren mit teils basischen und sauren Seitenkettenfunktionen aufgebaut sind, zeigen sie einen ausgeprägten Ampholytcharakter<sup>-a-</sup>. Abhängig vom pH-Wert tragen sie deshalb im sauren eine positive, im basischen Bereich eine negative Gesamtladung. Am isoelektrischen Punkt (pI) liegen sie als Zwitterionen vor, d.h. die Anzahl der positiven und negativen Ladungen ist gleich groß und

---

<sup>-a-</sup> Die terminalen Carboxy- und Aminogruppen tragen in der Regel nur wenig zur Gesamtladung bei

die Nettoladung nach außen ist null. Hydratation und Löslichkeit sind an diesem Punkt minimal.



**Abb. 3-1:** Säure-Base-Verhalten von Aminosäuren

Native Proteine können auf Grund physikalischer oder chemischer Einflüsse denaturieren, d.h. sie verlieren – unter Erhalt ihrer Primärstruktur – ihre biologischen Eigenschaften indem Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder auch Disulfidbrücken gelöst werden. Zur physikalischen Denaturierung können starkes Schütteln, Erhitzen, die Adsorption an Phasengrenzflächen oder auch starke Strahlung führen. Die chemische Denaturierung wird vor allem durch Säuren oder Basen, Detergenzien sowie durch wasserstoffbrückenlösenden Verbindungen wie z. B. Harnstoff ausgelöst.

Häufig ist dieser Prozess reversibel (Renaturierung). Werden jedoch neue kovalente Bindungen geknüpft – z. B. durch einen Thiol-Disulfid-Austausch – so kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung. Bei der thermischen Denaturierung, die ebenfalls nicht mehr reversibel ist, führt eine unkontrollierte Aggregation zur Bildung ungeordneter Knäuelstrukturen, so genannter *random coils*.

### 3.1.2 Aggregation von Proteinen und Peptiden

Allgemein handelt es sich bei Aggregation von Proteinen um einen Agglomerationsprozess in wässrigen bzw. physiologischen Lösungen [13]. Dieser stellt insbesondere im Bereich der Biopharmazeutika ein großes Problem dar und ist in den allermeisten Fällen nicht erwünscht. So sind unlösliche Aggregate in Proteinpräparaten generell für eine erfolgreiche Vermarktung inakzeptabel. Des Weiteren spielen Proteinaggregate bei der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten eine wichtige Rolle. So sind mehr als 20 Krankheiten bekannt die auf Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen und Peptiden zurückzuführen sind – hier können u. a. die Alzheimer- und Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington oder das Down-Syndrom genannt werden [14].

Grundsätzlich kann zwischen einer chemischer Aggregation, bei der neue kovalente Bindungen ausgebildet werden, und einer physikalischen Aggregation unterschieden werden. Bei letzterer wird die Primärstruktur der Proteine nicht beeinflusst. Entscheidend sind hier vor

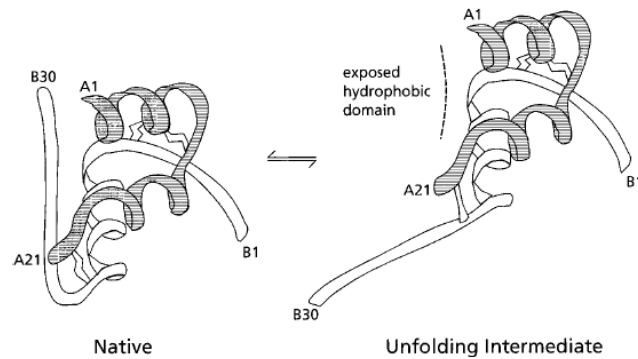
allen hydrophoben Wechselwirkungen der Seitenkette. In der Regel läuft dabei die Aggregation über partiell aufgefaltete Zwischenprodukte ab [15]. Sind Proteine hingegen gefaltet, so sind die hydrophoben Aminosäurereste häufig größtenteils im Inneren des Proteins „versteckt“. Umgekehrt sind sie bei aufgefalteten Proteinen (*random coil*) gleichmäßig verteilt. In beiden Fällen wird keine Aggregation begünstigt.

Insgesamt begünstigt eine Vielzahl von Faktoren die Aggregation von Proteinen und Peptiden. Diese können grob in strukturelle und umweltbedingte Faktoren unterschieden werden:

- a) Die Primärstruktur bestimmt grundsätzlich die Neigung zur Aggregation von Proteinen und Peptiden. Allgemein gilt die Faustregel, je hydrophober ein Protein ist desto eher neigt es zur Bildung von Aggregaten [16].
- b) Die Sekundärstruktur: Gewöhnlich enthalten Aggregate vor allem  $\beta$ -Faltblattstrukturen, während  $\alpha$ -Helices eher nicht zu Aggregation neigen. Der Hauptgrund hierfür ist, dass sich zwischen den parallel verlaufenden  $\beta$ -Strängen Wasserstoffbrückenbindungen besonders gut ausbilden können [17].
- c) Entscheidenden Einfluss auf das Aggregationsverhalten haben zudem eine ganze Reihe externer Einflüsse wie z. B. die Temperatur, der pH-Wert sowie die Art und Konzentration des verwendeten Puffersystems.

Das Erscheinungsbild von Proteinaggregaten kann sehr vielfältig sein. Meistens handelt es sich dabei um amorphe Strukturen. Für viele kleine Proteine bzw. für Peptide – so z.B. auch für Insulin und  $\beta$ -Amyloid – stellen jedoch Fibrillen die gängigste Form von Proteinaggregaten dar. Früher wurde angenommen dass der Proteinaggregation immer eine Denaturierung des nativen Proteins vorausgehen muss. Dies trifft zwar auf die meisten Fälle zu, jedoch können in manchen Fällen schon kleinste Störungen der Proteinstruktur zur Freilegung hydrophober Oberflächen führen, was wiederum zur Aggregation führt [18] (vgl. Abb. 3-2). So führen insbesondere Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zur fibrillären Assoziation von  $\beta$ -Faltblattstrukturen [19].

In der Praxis ergeben sich häufig Probleme, hinsichtlich der Frage, ab welcher Größe man von Proteinaggregaten sprechen kann. Einerseits können schon Dimere oder Trimere von Proteinen zu den Aggregaten gezählt werden. In der Praxis wird der Begriff jedoch häufig auf diejenigen Proteinanteile bezogen, die sich mit einem 0.2  $\mu\text{m}$  Membranfilter abtrennen lassen [18].



**Abb. 3-2:** Auffaltung eines nativen Insulin-Monomers und Freilegung eines hydrophoben Bereichs mit A2 (Isoleucin), A3 (Valin), B11 und B15 (jeweils Leucin) (aus [24])

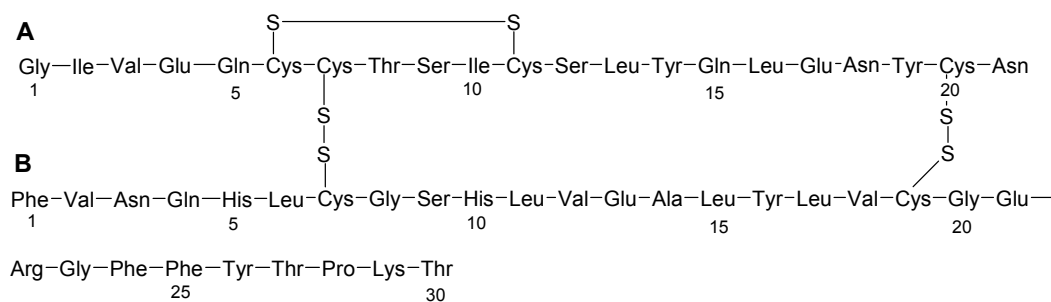
Untersuchungen haben gezeigt, dass fluorierte Alkohole wie z. B. 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) oder 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) die Umwandlung von der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur zurück zur  $\alpha$ -Helix bewirken können [7,8,9]. So konnte auch gezeigt werden, dass sich Insulin-Protofibrillen unter bestimmten Bedingungen durch Zusatz von TFE wieder auflösen lassen [10]. Fluorierte Alkohole sind jedoch in der Regel toxisch und nicht biokompatibel. Sie können somit für bestimmte Untersuchungen, insbesondere *in vivo*, nicht eingesetzt bzw. müssen anschließend aufwändig abgetrennt werden. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Biokompatibilität ist die Fixierung von  $\text{CF}_3$ -Gruppen – evtl. zusammen mit OH-Gruppen – auf der Oberfläche geeigneter Partikel. Diese Methode wurde unlängst für fluorierte Nanopartikel (Polyelektrolyt-Fluortensid-Komplexe) beschrieben [10]. Weitere vielversprechende Systeme sind durch die Synthese  $\text{CF}_3$ - und OH-haltiger *self-assembled monolayers* (SAMs) zu erwarten [20].

### 3.1.3 Insulin

Insulin ist ein blutzuckersenkendes Polypeptidhormon, das in der Bauchspeicheldrüse – genauer in den  $\beta$ -Zellen der *Langerhans'schen* Inseln gebildet wird. Es besteht aus zwei Ketten, wobei die A-Kette aus 21 Aminosäuren und die B-Kette aus 30 Aminosäuren besteht (Abb. 3-3). Diese sind jeweils über 2 Disulfid-Brücken verbunden. Die Molmasse beträgt ca.  $5800 \text{ g mol}^{-1}$ , es kann somit formal zu den Peptiden gezählt werden. Die hexamere Anordnung in Insulinkristallen, sowie der Neigung des Insulins zur Bildung von Dimeren und Tetrameren rechtfertigen jedoch gleichzeitig eine Zuordnung zu den Proteinen. Schweineinsulin unterscheidet sich vom Humaninsulin nur im Aminosäurerest B30 (Alanin statt Threonin), beim Rinderinsulin variieren zusätzlich die Positionen A8 (Alanin statt Threonin) und A10 (Valin statt Isoleucin). Für die biologische Wirksamkeit des Insulins sind

jedoch nur Aminosäuren verantwortlich, die sich in den einzelnen Spezies nicht unterscheiden. Aus diesem Grund ist Insulin nicht artspezifisch, die unterschiedlichen Insulin-Varianten zeigen eine ähnliche biologische Wirksamkeit [12].

Insulin wurde erstmals im Jahre 1921 von *Banting* (Nobelpreis 1923) und *Best* entdeckt, eine Totalsynthese wurde 1963 von der Arbeitsgruppe *Zahn* beschrieben [21]. Die Chemosynthese hat jedoch auf Grund der Komplexität des Insulins keine kommerzielle Bedeutung. Der Großteil des heute produzierten Humaninsulins wird deshalb gentechnisch hergestellt. Eine weitere wichtige Methode ist die Semisynthese von Humaninsulin aus Schweineinsulin – extrahiert aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen – durch enzymatischen Aminosäureaustausch.



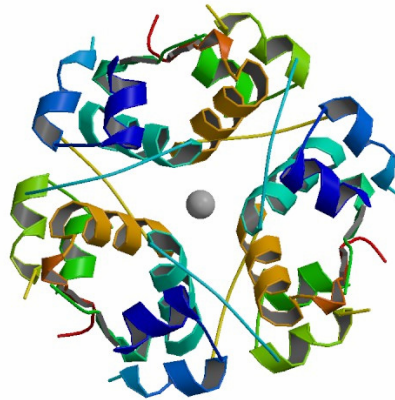
**Abb. 3-3:** Primärstruktur von Humaninsulin

Im Körper wird Insulin als Hexamer in den Vesikeln des sog. Golgi-Apparats der  $\beta$ -Zellen gespeichert, wobei die einzelnen Monomere über Zinkionen gebunden und dadurch stabilisiert sind (vgl. Abb.3-4). Biologisch wirksam ist jedoch ausschließlich das Insulinmonomer. Eine kritische Eigenschaft des Insulins ist seine Neigung zur Bildung amyloider Fibrillen. Diese wurden z. B. *in vivo* bei Patienten nach subkutaner Injektion von Insulin diagnostiziert [22]. Neben Ablagerungen bei Typ II-Diabetes-Patienten ist die Fibrillenbildung jedoch vor allem ein großes Problem bei der Herstellung, Lagerung und der Verabreichung von gelöstem Insulin in Diabetespräparaten [23].

Die Tendenz zur Bildung von Aggregaten hängt zunächst stark von der Spezies ab. So zeigen Human- und Schweineinsulin ein ähnliches Verhalten. Rinderinsulin aggregiert hingegen deutlich schneller. Der Grund hierfür ist wohl in der stärkeren Hydrophobie der A8 Seitenkette (Alanin) beim Rinderinsulin zu finden [24]. Auslöser für die Bildung von Insulinfibrillen, die bevorzugt an Phasengrenzflächen auftritt, sind vor allem erhöhte Temperaturen, mechanische Belastung (Schütteln), sowie hydrophobe Oberflächen. Die Aggregationsneigung von Insulin zeigt sich besonders stark bei sauren pH-Werten. Dabei spielt neben dem pH-Wert insbesondere die Art der Säure eine große Rolle. Die

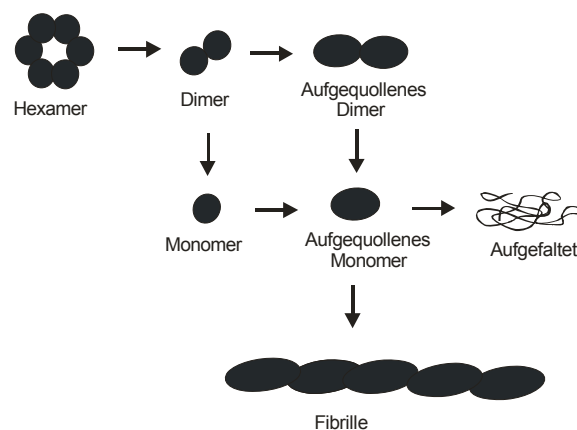


Geschwindigkeit der Fibrillenbildung ändert sich wie folgt:  $\text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HCl} > \text{H}_3\text{PO}_4 \approx \text{Zitronensäure} \gg \text{Essigsäure}$  [25].



**Abb.3-4:** Quarternäre Struktur des Rinderinsulin-Hexamers mit einem Zinkion im Zentrum; Struktur wurde mittels Röntgenbeugung ermittelt, Auflösung 2.25 Å; Quelle: RCSB Protein Data Base, Original Daten: Smith et.al [26].

Der Grund für dieses Verhalten ist der spezielle Mechanismus der Insulinaggregation: Dieser verläuft über ein teilweise aufgefaltetes Monomer (vgl. Abb. 3-5). Das Hexamer hingegen ist auf Grund seiner Struktur – genauso wie das Tetramer oder Dimer – vor einer Aggregation geschützt. Die Abbildung ist jedoch stark vereinfacht. Zunächst bilden sich aus den Monomeren oligomere Strukturen mit einer Länge von ca. 20 nm die aus fünf bis sechs Monomereinheiten aufgebaut sind [27]. Aus diesen wiederum entstehen anschließend die Protofibrillen (Durchmesser 1.5 – 5 nm), aus denen wiederum makroskopische Fibrillen mit Durchmessern von 3 - 15 nm und Längen bis zu mehreren µm entstehen [23,24]. Die interne Struktur entspricht dabei einer aufgeweiteten (*extended*)  $\beta$ -Faltblattstruktur senkrecht zur Fibrillenachse [28].



**Abb. 3-5:** Möglicher Mechanismus der Proteinaggregation am Beispiel des Insulins (nach [29])

Auf Grund der starken hydrophoben Wechselwirkungen sind die Fibrillen in den meisten wässrigen Lösungsmittelgemischen wie z.B. 7 M Harnstoff von pH 2 bis 8, 5 M Guanidinhydrochlorid, in 50% Acetonitril oder auch bei Zusatz von ionischen bzw. nichtionischen Detergentien unlöslich. Allerdings kann unter bestimmten Umständen in alkalischem Medium bei  $\text{pH} > 11$  und anschließender Neutralisierung eine Renaturierung erzielt werden [24].

## 3.2 *Perlcellulose*

Mikrofeine Cellulosepartikel, welche auch als Perlcellulosen (engl. *cellulose beads*) bezeichnet werden, stellen hochporöse Gebilde aus Regeneratcellulose dar. Die Größe der Perlen schwankt je nach Herstellungsbedingungen zwischen 2 und 1000 µm. Erste Informationen über Perlcellulose wurden bereits in einem Patent von *O'Neill* und *Reichardt* im Jahre 1951 publiziert [30]. Erste kommerzielle Produkte wurden in den 1970er Jahren von Reanal (Ungarn) und Pharmazia (Schweden) auf den Markt gebracht [31].

### 3.2.1 *Herstellungsmethoden*

Perlcellulose kann auf verschiedenen Wegen hergestellt werden. Alle bisher entwickelten Verfahren basieren jedoch auf den folgenden grundlegenden Syntheseschritten:

- a) Bildung einer Lösung von Cellulose oder eines Cellulosederivats
- b) Bildung von sphärischen Teilchen
- c) Verfestigung der Teilchen
- d) Regenerierung der Cellulose in den festen sphärischen Teilchen
- e) Nachbehandlung und Reinigung

Man kann bei der Herstellung der Cellulosepartikel zwei grundsätzliche Verfahrenweisen einsetzen. Zum Einen kann eine Eintropf- bzw. Sprühtechnik angewendet werden, andererseits können Dispersionstechniken eingesetzt werden [32,33,34,35].

Das Sprühverfahren ist das älteste, es wird heute in der Regel jedoch nicht mehr angewandt. Hierbei wird eine wässrige Viskoselösung – meist alkalisches Cellulose-Xanthogenat <sup>-a-</sup> – unter hohem Druck über eine Düse versprüht. Die dabei entstehenden Tröpfchen werden direkt oder über den Umweg eines Formungsbades <sup>-b-</sup> in ein Fällbad <sup>-c-</sup> gebracht, wo sie ihre endgültige Gestalt erhalten. Dann folgen eine Verfestigungsphase – z. B. in einem Natriumsulfatbad bei 90°C – und ein abschließender Waschprozess.

Wesentlich häufiger wird das Suspensionsverfahren eingesetzt: Eine Lösung von Cellulose bzw. eines Cellulosederivats wird zunächst mit geeigneten Rührtechniken dispergiert. Als Lösungsmittel für Cellulose kann u. a. eine ammoniakalische Kupferhydroxid-Lösung (Cuoxam-Lösung) verwendet werden [36,37]. Häufig verwendete Cellulosederivate sind

---

<sup>-a-</sup> Cellulose-Xanthogenat wird aus der Reaktion von Cellulose mit Natronlauge und Schwefelkohlenstoff erhalten

<sup>-b-</sup> meist ein hydrophobes Lösungsmittelgemisch aus Benzen und Tetrachlorkohlenstoff

<sup>-c-</sup> z. B. Schwefelsäure mit Natrium- und Zinksulfat oder eine saure Mischung aus Benzen, Aceton und Eisessig [36]

Xanthogenat in alkalischer Lösung [37,38,39,40] oder Celluloseacetat in organischen Lösungsmittelgemischen wie Methylenchlorid / höhere Alkohole [41,42] bzw. Methylenchlorid / Methanol [5,43]. Die Cellulose(derivat)lösung wird anschließend in einem Nicht-Lösungsmittel dispergiert. Dieses muss sich hinsichtlich Dichte und Siedepunkt deutlich vom Lösungsmittel unterscheiden und darf nicht in diesem löslich sein. Als Beispiele können hier Benzol für Cuoxam-Lösung [36], Chlorbenzol für Viskose [40] und Isopropanol [5], reines Wasser [42] oder wässrige Gelatinelösungen [41] für Celluloseacetat-Lösungen genannt werden. Durch die Induzierung eines Sol-Gel-Übergangs erfolgt die Verfestigung der Tröpfchen. Dies kann durch den Zusatz von Salzen oder Säuren als Fällungsmittel [36,37], durch Vernetzung der Cellulose – z. B. mittels Epichlorhydrin [44] – oder durch die Änderung der Temperatur erfolgen [38,39,45]. Die Regeneration von Cellulosederivaten erfolgt anschließend durch eine saure Hydrolyse im Falle von Cellulosexanthogenat [36,38,39] bzw. durch basische Hydrolyse im Falle von Celluloseacetat [37,45]. Wie auch beim Sprühverfahren folgen abschließend noch Waschschrte um Lösungsmittel und andere Reagenzien abzutrennen.

Die Größe und Größenverteilung der Perlen lassen sich über einen weiten Bereich gezielt steuern. Einfluss haben u. a. die Konzentration der Celluloselösung, die Temperatur, die Rührintensität sowie Art- und Zusammensetzung des Dispersionsmittels.

### 3.2.2 *Eigenschaften und Anwendungen*

Mikrofeine Cellulosepartikel, die auf diesem Weg hergestellt werden, zeichnen sich durch eine sphärische Form sowie eine hohe Porosität aus. Ferner wird durch die übermolekulare Struktur der Cellulose eine hohe mechanische Stabilität erreicht, was für den vorgesehenen Einsatz eine wichtige Voraussetzung darstellt. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die hohe chemische Stabilität von Perlcellulose. So ist sie sowohl im sauren als auch im alkalischen Medium (d.h. von pH 2 bis 12) sowie gegen üblicherweise verwendete organische Lösungsmittel stabil.

Frühere Arbeiten zeigen die Eignung von Cellulosepartikel in Form von reinen Perlcellulosen sowie nach deren chemischer Modifizierung als stationäre Phase für chromatographische Trennungen [5,46,47]. SEC-Untersuchungen mit Perlcellulosen zeigten gute Trenneffekte in Abhängigkeit von der Porosität und Vernetzung für Dextrane als Modellverbindungen [3]. Weiterhin ist bekannt, dass die Ionenaustauschfähigkeit von modifizierten Perlcellulosen prinzipiell auch zur Trennung von Proteinen eingesetzt werden kann [4]. Die wesentlichen bekannten Anwendungen von Cellulosepartikeln in der Chromatographie nutzen die

Wechselwirkungen zwischen zu trennenden Materialien und dem cellulosischen Säulenmaterial [2,5,6].

### 3.2.3 *Modifizierung von Cellulose*

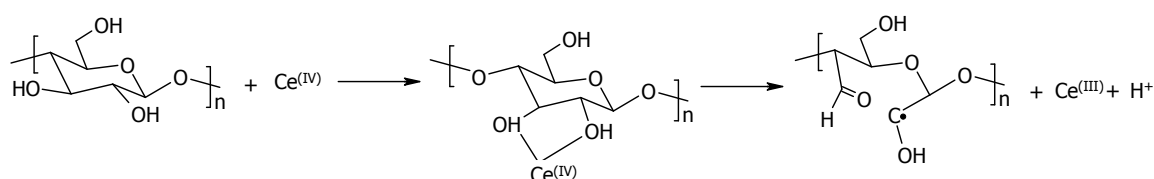
#### a) *Pfropfung von Cellulose*

Unter Cellulose-Pfropfcopolymer (auch: Graftcopolymer) versteht man Cellulose, auf deren Rückgrat durch kovalente Bindungen synthetische Polymere gebunden werden. Durch eine gezielte Pfropfung auf die Perlcellulose-Oberfläche lassen sich deren physikalische und chemische Eigenschaften steuern. Grundsätzlich lassen sich drei Methoden unterscheiden: Neben der ionischen Pfropfcopolymerisation, sowie der Pfropfung durch Additions- oder Kondensationsreaktionen, stellt die radikalisch initiierte Pfropfung die am häufigsten angewandte Methode dar. Hierzu kann eine Vielzahl von verschiedenen Monomeren – u. a. Vinyl- oder Acrylmonomere – gepfropft werden. Auf Grund einer relativ aufwändigen Synthese und des somit hohen Preises haben Cellulose-Pfropfcopolymere bisher keine breite Anwendung gefunden. Als Beispiel für Spezialanwendungen können hier z. B. Cellulose-Ionenaustauscher oder Adsorptionsmittel für Schwermetalle genannt werden. Werden auf dem Celluloserückgrat freie Radikale gebildet, können diese eine radikalische Polymerisation starten. Diese Methode besitzt eine Reihe von entscheidenden Vorteilen gegenüber anderen Methoden (z. B. Anionische Polymerisation): Sie kann in wässrigem Milieu durchgeführt werden, ist für eine Vielzahl von Monomeren anwendbar und relativ unempfindlich gegenüber Verunreinigungen.

Freie Radikale können zum Einen durch Bestrahlung mittels  $\gamma$ - oder UV-Strahlen erzeugt werden. Diese Methode erweist sich jedoch als sehr unspezifisch und führt in der Regel zur Bildung von erheblichen Mengen von Homopolymer [48]. Effektiver ist eine Erzeugung von Makroradikalen mittels chemischer Redoxsysteme. In der Regel werden zunächst niedermolekulare Primärradikale gebildet die anschließend ihre Radikaleigenschaften auf die Cellulose durch H-Abstraktion übertragen. Typische Initiatorsysteme dieser Gattung stellen u. a. Persulfate oder Permanganate in Gegenwart von Säuren dar [49]. Allerdings können auch hier nicht unerhebliche Mengen von Homopolymer gebildet werden.

Durch eine direkte Erzeugung von Radikalen auf dem Cellulosesubstrat z. B. durch Cer(IV)-Ionen kann dies zum Großteil vermieden werden. Die Bildung von Homopolymer kann hier nur durch eine Übertragungsreaktion zum Monomer erfolgen [50]. Cer(IV) wird zunächst an den vicinalen OH-Gruppen der Cellulose komplexiert. Durch eine Reduktion der Metallionen und Ringspaltung entstehen Celluloseradikale, die anschließend eine Polymerisation starten können. Der Anhydroglucoserings wird dabei zwischen der Positionen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> gespalten

(Vgl. Abb. 3-6). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass Metallionen nur schwer aus dem Produkt entfernt werden können.



**Abb. 3-6:** Erzeugung freier Radikale auf dem Cellulose-Substrat durch Reduzierung von Cer(IV)-Ionen

Die radikalische Pfropfung mittels Cer(IV)-Redoxsystemen liefert in der Regel nur kurze Polymerketten. Dies kann für die Modifizierung von poröser Cellulose von Vorteil sein, da dadurch die Porengröße nur geringfügig beeinflusst wird. Lange Ketten könnten dazu führen, dass die Porenstruktur der Perlcellulose „verklebt“ wird. Durch kurze Ketten kann zudem eine gleichmäßigere Verteilung der Fluor-Gruppen auf der Oberfläche erzielt werden.

#### b) Polymeranaloge Umsetzung an Cellulose

Unter polymeranalogen Umsetzungen versteht man Reaktionen an Makromolekülen, wobei deren chemische Zusammensetzung geändert wird, nicht jedoch der Polymerisationsgrad. Reaktionen an Cellulose sind bereits seit über 160 Jahren bekannt, die Nitrierung von Cellulose wurde erstmals 1846 durchgeführt [51]. Auch heute noch nimmt die Modifizierung von Cellulose einen herausragenden Platz unter polymeranalogen Umsetzungen von Polymeren ein. Besonders hervorzuheben sind u. a. Celluloseacetat, Methylcellulose oder die bereits erwähnte Nitrocellulose, die jeweils eine große wirtschaftliche Bedeutung haben.

Anders als bei der Pfropfcopolymerisation werden nur niedermolekulare Gruppen auf die Cellulose aufgebracht. Theoretisch wird dadurch erreicht, dass die hydrophoben Gruppen gleichmäßiger auf der Celluloseoberfläche verteilt werden. Bei der Pfropfung von Polymeren hingegen wird lokal ein hoher Anteil an hydrophoben Gruppen eingeführt, so dass hydrophobe „Inseln“ entstehen können.

Jede Anhydroglucoseeinheit der Cellulose besitzt drei Hydroxylgruppen, an denen eine Derivatisierung durchgeführt werden kann. Wie auch bei der Umsetzung von niedermolekularen Alkoholen erfolgt die Einführung von Ester- und Etherbindungen an der C2-, C3- und C6-Position [52].

Zur Bildung von Estern können u. a. Säurechloride oder Säureanhydride eingesetzt werden. Durch homogene oder heterogene Reaktionsführung sowie durch die Wahl des Lösungsmittels lässt sich die Reaktion steuern. Für die Modifizierung von Perlcellulose ist jedoch nur eine heterogene Reaktionsführung möglich, da durch Auflösung der Cellulose die Porenstruktur

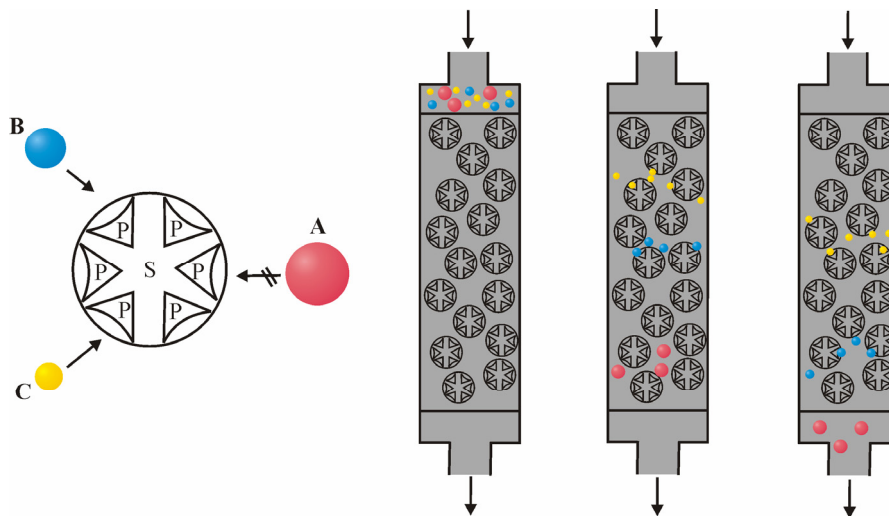
zerstört werden würde. Zu bevorzugen ist zudem eine Umsetzung in wässrigem Milieu, da eine zeitaufwendige und teure – auf Grund des hohen Bedarfs an organischen Lösungsmitteln – Trocknung mittels Lösungsmittelaustausch wenig wirtschaftlich ist. Allerdings ist eine Modifizierung in wässriger Lösung nur schwer zu realisieren da es hier zu einer Hydrolyse der reaktiven Gruppen als Nebenreaktion kommt. Bei preiswerten Reagenzien wie Essigsäureanhydrid kann dieses im Überschuss eingesetzt werden. Bei teuren Spezialchemikalien wie z. B. Fluorderivaten von Carbonsäuren kann es gegebenenfalls sinnvoller sein die Reaktion in einem aprotischen Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril durchzuführen.

Neben der Bildung von Estern kann eine Modifizierung von Cellulose durch Einführung von Ether-Gruppen erfolgen. Dies geschieht in der Regel durch die Reaktion von Alkylhalogenid bzw. Alkylsulfat mit Alkalicellulose [53]. Die Umsetzung mit Natronlauge führt jedoch in der Regel zu einer starken Quellung der Cellulose, so dass dadurch die Porenstruktur von Perlcellulose stark beeinflusst werden würde. Deswegen sollte die polymeranaloge Modifizierung der Cellulose mit Alkyljodid unter neutralen Bedingungen erfolgen. Die Reaktivität des Substrats wird dadurch zwar stark verringert, wenn jedoch nur schwach modifizierte Produkte angestrebt werden, ist diese Methode durchaus geeignet.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatographie*; SEC), in der Literatur häufig auch als Gelpermeationschromatographie (GPC) bezeichnet, stellt eine Form der Flüssigkeits-Chromatographie dar. Dabei werden die gelösten Makromoleküle durch poröse Gele gemäß ihres hydrodynamischen Volumens  $V_h$  getrennt und nicht, wie z. B. in der HPLC, auf Grund von Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Der Trennprozess beruht auf der spezifischen Verteilung der gelösten Makromoleküle in einem Lösungsmittel, das sich sowohl innerhalb als auch außerhalb der Gelporen befindet. Dies bedeutet, dass sich die stationäre Phase von der mobilen Phase nur in der Bewegungsfähigkeit und nicht im chemischen Aufbau unterscheidet. Die Polymermoleküle verteilen sich in den beiden Phasen je nach Größe des Knäuelvolumens in den zur Verfügung stehenden Poren mit unterschiedlichen Durchmessern. Daher verlassen große Moleküle die Säule zuerst, kleine eluieren später, da diese tiefer in das poröse Material eindringen.



**Abb. 3-7:** Schematische Darstellung des Trennprozesses; S: poröses Partikel, P: Pore, A-C: zu trennende Teilchen mit unterschiedlichem hydrodynamischem Radius

Um diesen Effekt zu quantifizieren, werden die folgenden Volumina eingeführt:

$V_e$ : Elutionsvolumen des Polymers

$V_0$ : Totvolumen bzw. Zwischenkornvolumen, Volumen des Lösungsmittels zwischen den Kugeln

$V_i$ : Volumen des Lösungsmittels in den Poren

$V_{ges}$ : Totalvolumen  $V_{ges} = V_i + V_0$

Mit Hilfe eines Boltzmann-Ansatzes kann die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Polymerknäuel in eine Pore eintritt, beschrieben werden. Hierfür wird der sogenannte chromatographische



Radius des Polymers  $r_c$  mit dem mittleren Porenradius des Säulenmaterials  $R_p$  verglichen, wobei folgende Formel erhalten wird:

$$\text{Gl. 3-1} \quad V_e = V_0 + V_i \exp\left(-\frac{r_c}{R_p}\right)$$

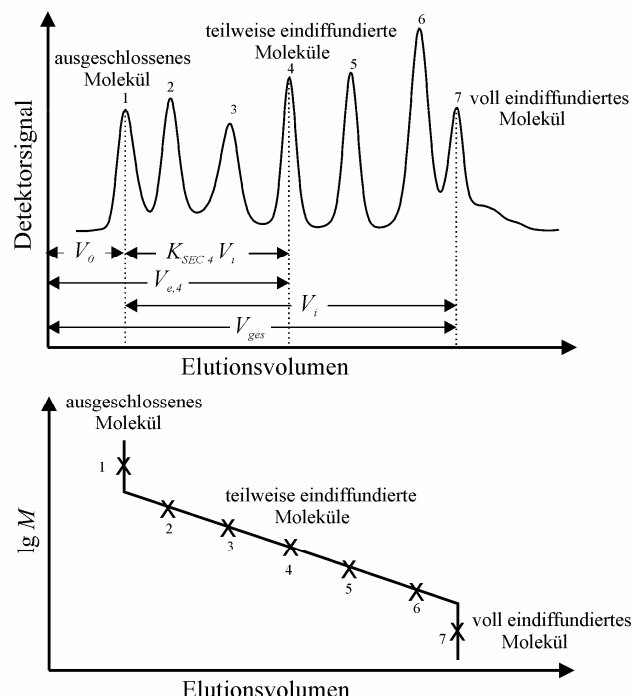
Es können zwei Extremfälle unterschieden werden. Für den Fall, dass der Polymerradius deutlich größer als der mittlere Porenradius ist, gilt:

$$r_c \gg R_p \quad \rightarrow \quad V_e = V_0$$

Das Totalvolumen bzw. die sog. Trennschwelle wird erreicht, wenn sich das Elutionsvolumen mit abnehmender Größe der Probenmoleküle nicht mehr ändert ( $\exp(-r_c / R_p) = 1$ ):

$$r_c \ll R_p \quad \rightarrow \quad V_e = V_i + V_0$$

Da in der Praxis für ein Polymer vor allem die Mittelwerte der Molmassen sowie die Molmassenverteilung von Interesse sind, ist es nötig, die Messgröße Elutionsvolumen auf experimentellem Wege in die Zielgröße Molmasse zu transformieren. Im einfachsten Fall geschieht dies mit Hilfe der so genannten *Standard-Kalibrier-Methode*: Für eine Reihe von Referenzmaterialien mit bekannter Molmasse wird eine Kalibrierkurve des Elutionsvolumens gegen die Molmasse erstellt.



**Abb. 3-8:** Standard-Kalibrierkurve für die SEC; Verwendet wurden in diesem Beispiel sieben Polymerstandards mit enger Molmassenverteilung

Die so erhaltene Kalibrierkurve kann in drei Teilbereiche unterteilt werden (Abb. 3-8): Oberhalb des ausgeschlossenen Volumens (totaler Ausschluss) und unterhalb der Trennschwelle

(totale Permeation) erfolgt keine Stofftrennung und die Kurve verläuft annähernd parallel zur Ordinate an den Stellen  $V_0$  und  $V_{ges}$ . Im Bereich dazwischen zeigt die Kalibrierkurve einen s-förmigen Verlauf mit einem linearen Trennbereich, der mit einem Polynom angepasst werden kann (Gl. 3-2). Die Steigung des linearen Bereichs gibt Auskunft über die Trennleistung der Säule: Sie ist umso besser, je flacher sie ist. Häufig wird die Kalibrierkurve durch ein Polynom dritten Grades mit ausreichender Genauigkeit beschrieben [54].

$$\text{Gl. 3-2} \quad \lg M = A_0 + A_1 V_e + A_2 V_e^2 + \dots A_n V_e^n$$

Mit einer Standardkalibrierung können streng genommen nur Molmassenverteilungen von Polymeren bestimmt werden, auf die eine SEC-Säule kalibriert ist. Dies ist damit zu erklären, dass sowohl Größe als auch Form eines Polymerknäuels nicht ausschließlich von der Molmasse, sondern auch von der Konstitution und Mikrostruktur sowie von den Wechselwirkungen Polymer/Lösungsmittel abhängen.

Besitzt ein Probenmolekül ein kleineres hydrodynamisches Volumen als das entsprechende Referenzmolekül mit derselben Molmasse, so wird mit dieser Kalibriermethode eine zu kleine Molmasse bestimmt, da kleine Moleküle später eluieren. Als Beispiel kann hier Polystyrol (PS) und bromiertes Polystyrol genannt werden: Letzteres besitzt eine deutlich höhere Dichte und eluiert auf Grund des kleineren hydrodynamischen Volumens später als Polystyrol mit derselben Molmasse. Dadurch erhält man für bromiertes PS bei Verwendung einer Standard-Kalibrierung mit PS eine zu geringe Molmasse.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist der Einsatz einer *universellen Kalibrierung* nach *Benoit* [55], basierend auf dem Prinzip, dass das Produkt aus Grenzviskosität  $[\eta]$  und Molmasse  $M$  entsprechend der *Flory-Fox-Gleichung* [56] direkt proportional dem hydrodynamischen Volumen ist, wobei  $\langle r^2 \rangle$  das Quadrat des Trägheitsradius und  $\Phi_r$  den Durchspülungsfaktor (auch Flory Konstante;  $\Phi_r = 4.22 \cdot 10^{24} \text{ mol}^{-1}$ ) darstellen <sup>-a-</sup>.

$$\text{Gl. 3-3} \quad [\eta]M = \Phi_r \langle r^2 \rangle^{3/2}$$

Somit erhält man eine Gleichung der universellen Kalibrierung, wobei bei gleichen Elutionsvolumina gilt:

$$\text{Gl. 3-4} \quad [\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2 \quad \text{mit } [\eta]_1 : \text{Grenzviskosität Standard} \quad M_1 : \text{Molmasse Standards} \\ [\eta]_2 : \text{Grenzviskosität Probe} \quad M_2 : \text{Molmasse Probe}$$

Es gelten jedoch folgende Einschränkungen: Für Polymere mit niedriger Molmasse gilt Gl. 3-3 nur bedingt, da in diesem Fall die Polymerketten nicht mehr als statistische Knäuel vorliegen,

---

<sup>-a-</sup> Der Durchspülungsfaktor  $\Phi_r$  (auch Flory-Konstante) ist für hochmolekulare ungestörte Knäuel eine universelle Konstante

sondern mehr oder weniger gestreckt sind. Des Weiteren gibt es z. B. Abweichungen für stark verzweigte Polymere (z. B. Poly-Ethylenimine) sowie für Proteine. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Durchspülungsfaktor  $\Phi_r$  der *Flory-Fox*-Gleichung nur für flexible, lineare und nicht-geladene Polymere einen Wert von  $4.2 \cdot 10^{24} \text{ mol}^{-1}$  besitzt [57].

Sind für Polymerprobe und Polymerstandard die Koeffizienten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  der *Kuhn-Mark-Houwink*-Gleichung (KMH) bekannt, so erhält man durch Umformen die folgende Gleichung:

$$\text{Gl. 3-5} \quad \lg M_2 = \frac{1}{1 + \alpha_2} \lg \frac{K_1}{K_2} + \frac{1 + \alpha_1}{1 + \alpha_2} \lg M_1$$

Sind die KMH-Koeffizienten jedoch nicht bekannt, benötigt man für die universelle Kalibrierung einen kontinuierlich messenden Viskositätsdetektor, so dass an jeder Stelle des Elugramms neben der Änderung der Massenanteile auch die Grenzviskosität berechnet werden kann. Man erhält dadurch eine für lineare und schwach verzweigte Polymere allgemeingültige Kalibrierkurve, indem von einer Reihe von polymeren Standardmaterialien mit bekannten Molmassen und Molmassenverteilungen jeweils Elutionsvolumen  $V_e$  und Grenzviskosität  $[\eta]$  bestimmt werden und das Produkt  $[\eta] M$  über  $V_e$  aufgetragen wird. Dadurch ist es möglich, eine Vielzahl im Aufbau und in der Struktur unterschiedlicher Polymere mit einer Kalibrierkurve zu charakterisieren.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines molmassensensitiven MALLS-Detektors (*Multi Angle Laser Light Scattering*). Dadurch ist es möglich, an jeder Stelle des Chromatogramms on-line die absolute Molmasse zu bestimmen. Hierzu wird das Streulicht mit bis zu achtzehn in einem Bogen angeordneten Photodioden beobachtet (Winkel im Bereich von  $18^\circ$  bis  $135^\circ$ ). Die reduzierte Streuintensität korreliert mit der gewichtsmittleren Molmasse  $M_w$  wie folgt:

$$\text{Gl. 3-6} \quad \frac{K \cdot c}{R_g} = \frac{1}{M_w P(\vartheta)} + 2A_2 c$$

Dabei ist  $c$  die Polymerkonzentration,  $A_2$  der 2. Virialkoeffizient und  $P(\vartheta)$  der Formfaktor, der die Winkelabhängigkeit des Streulichtes beschreibt. In der optischen Konstante  $K$  sind die optischen Parameter des Systems zusammengefasst, diese sind der Brechungsindex des Lösungsmittels  $n_0$ , die Laserwellenlänge  $\lambda_0$  sowie das Brechungsindexinkrement der Probe  $dn/dc$ :

$$\text{Gl. 3-7} \quad K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} (dn/dc)^2$$

Durch die Extrapolation der Winkelabhängigkeit der gemessenen Streuintensitäten kann zusätzlich der Trägheitsradius  $r_g$  (engl. *radius of gyration*) berechnet werden. Trägt man  $K \cdot c / R_g$  gegen  $\sin^2(\vartheta/2)$  auf so erhält man  $M_w$  aus dem Achsenabschnitt und  $r_g$  aus der Geraden-

steigung. Auf eine Extrapolation der Konzentration, wie sie bei Off-line-Messungen notwendig ist, kann verzichtet werden, da in der Regel die Polymerkonzentration im Eluat der SEC äußerst gering ist. Die Erstellung einer Kalibrierkurve ist im Fall der MALLS-SEC nicht nötig.

### 3.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Dynamischen Lichtstreuung (auch als Photonen-Korrelationsspektroskopie oder quasielastische Lichtstreuung bezeichnet) beruht auf der Messung der zeitabhängigen Fluktuation der Intensität von Streulicht. Diese Fluktuationen basieren auf der Brownschen Molekularbewegung, wobei die Beweglichkeit der Partikel durch Messung des Diffusionskoeffizienten  $D$  quantifiziert wird. Mit Hilfe der *Stokes-Einstein*-Gleichung lässt sich daraus der Stokes-Radius  $r_s$  vom gelösten Teilchen berechnen:

$$\text{Gl. 3-8} \quad r_s = kT/6\pi\eta D,$$

wobei  $k$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die Temperatur und  $\eta$  die dynamische Viskosität des Lösungsmittels ist. Die Korrelationsfunktion entspricht einer exponentiell fallende Funktion der Verzugszeit  $\tau$ , wobei  $B$  den Kurvenanfang darstellt und  $A$  den Wert der Basislinie der Korrelationsfunktion.

$$\text{Gl. 3-9} \quad G(\tau) = \int I(t)I(t+\tau)dt = A[1 + Be^{-2q^2 D \tau}]$$

Der Streuvektor  $q$  ist definiert als Funktion des Brechungsindex des Lösungsmittels  $\tilde{n}$ , der Vakuumwellenlänge des Lasers  $\lambda_0$  sowie des Steuwinkels  $\Theta$ :

$$\text{Gl. 3-10} \quad q = \frac{4\pi\tilde{n}}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right)$$

Aus Gl. 3-9 kann die Autokorrelationsfunktion  $g_I(\tau)^{-1}$  bestimmt werden und diese mit einer Exponentialfunktion angepasst werden. Mit dem so erhaltenen Diffusionskoeffizienten  $D$  kann wiederum mit Gl. 3-8 der hydrodynamische Radius  $r_s$  bestimmt werden. Die erhaltene Größe wird nach ISO 13321 auch als z-mittlerer Radius bezeichnet [58].

Für polydisperse Proben kann Gl. 3-11 wie folgt beschrieben werden, wobei  $g_I(\tau)$  die Summe aller exponentiellen Abfälle der Korrelationsfunktion beschreibt:

$$\text{Gl. 3-11} \quad G(\tau) = A[1 + Bg_1(\tau)^2]$$

### 3.3.3 Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuung (engl. *small-angle X-ray scattering*, SAXS) stellt eine Methode zur Untersuchung der Lösungsstrukturen von (Bio)makromolekülen dar. Dabei können Partikel mit Molmassen im Bereich zwischen ca. Eintausend und einigen Millionen  $\text{g mol}^{-1}$  erfasst werden.

Während eines Streuexperiments wird eine wässrige Probe mit Röntgenstrahlen durchstrahlt – die Wellenlängen  $\lambda$  liegen dabei im Bereich von ca. 0.15 nm. Die Strahlen treffen auf einen Detektor wobei die Streuintensität  $I(q)$  in Abhängigkeit des Streuvektors  $q$  aufgezeichnet wird. Dieser ist identisch mit dem Streuvektor der dynamischen Lichtstreuung (siehe Gl. 3-10). Große Strukturen streuen bei kleinen Winkeln, kleine Strukturen hingegen bei großen Winkeln. Bei der SAXS wird in der Regel in einem Streuwinkelbereich von  $0.02^\circ < \Theta < 4.5^\circ$  gemessen. Dies entspricht – entsprechend des Sampling-Theorems ( $D_{\max} = 2\pi / q_{\min}$ ) – Größenordnungen von 200 bis 2 nm.

Zur Annäherung an die tatsächlich vorliegende Partikelform werden verschiedene Approximationsverfahren verwendet, die unterschiedliche geometrische Modelle zur Grundlage haben. Das einfachste geometrische Modell zur Annäherung an die Streukurve ist eine monodisperse Kugel. Die Streuintensität  $I(q)$  eines radial symmetrischen Teilchens kann wie folgt beschrieben werden:

$$\text{Gl. 3-12} \quad I(q) = \text{Scale} \cdot (\rho_{\text{Partikel}} - \rho_{\text{LM}})^2 \cdot V^2 \frac{9}{(qr)^6} [\sin(qr) - qr \cos(qr)]^2$$

Dabei stellt  $r$  den Kugelradius,  $V$  das Kugelvolumen und  $q$  den Streuvektor dar. Desweiteren werden die Streulängendichten  $\rho$  der Partikel und des Lösungsmittels benötigt. *Scale* stellt einen Skalierungsfaktor dar. Für einen langen Zylinder wird die Streuintensität mit dem Radius  $r$  und der Länge  $l$  wie folgt beschrieben (für  $r \ll l$ ), wobei  $J_1$  die erste Ordnung der Besselfunktion darstellt:

$$\text{Gl. 3-13} \quad I(q) = \text{Scale} \cdot (\rho_{\text{Partikel}} - \rho_{\text{LM}})^2 \cdot \left[ \frac{2J_2(qr)}{rq} \frac{\sin(\frac{1}{2}qL)}{\frac{1}{2}qL} \right]^2$$

Liegen Kugeln und Zylinder nebeneinander vor, so können die beiden Modelle kombiniert werden. Aus den erhaltenen Skalierungsfaktoren können anschließend die Massenanteile der einzelnen Spezies ermittelt werden.

### 3.4 Porosimetrie

Unter dem Begriff Porosimetrie versteht man im Allgemeinen analytische Verfahren zur Ermittlung von Porositäts-Kenngrößen eines Feststoffs. Diese sind u. a. die Porengrößenverteilung, der mittlere Porendurchmesser, das Porenvolumen und die spezifische Oberfläche.

Entsprechend einer Empfehlung der IUPAC können drei verschiedene Porenarten entsprechend ihrer Porendimension  $D$  unterschieden werden [59]:

- Mikroporen:  $D < 2 \text{ nm}$
- Mesoporen:  $2 \text{ nm} < D < 50 \text{ nm}$
- Makroporen:  $D > 50 \text{ nm}$

Von den zahlreichen heute zur Verfügung stehenden Porenbestimmungsmethoden, von denen viele erst in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden [60], werden bis heute in Industrie- und Forschungslaboratorien vor allem die beiden "klassischen" Methoden Quecksilberporosimetrie und Gasadsorption zur Charakterisierung poröser Materialien eingesetzt.

#### 3.4.1 Quecksilberporosimetrie

Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass eine nicht-benetzende Flüssigkeit nur dann in eine Pore eindringen kann, wenn ein äußerer hydrostatischer Druck angewandt wird.

Die Messung erfolgt nach dem Verfahren von *Ritter* und *Drake* [61,62], das u. a. in der DIN 66133 [63] beschrieben wird. Hierfür wird die Probe in ein spezielles Probengefäß, das als Dilatometer oder Penetrometer bezeichnet wird, eingewogen und evakuiert, um Luft aus den Poren zu entfernen. Das evakuierte Probengefäß wird in der Niederdruckstation des Porosimeters mit Quecksilber gefüllt, so dass die Probe davon komplett umgeben ist. Danach wird das aufgefüllte Probengefäß mit der Hochdruckstation verbunden, in der beginnend bei Normaldruck über ein Hydrauliksystem schrittweise der Druck erhöht und das Quecksilber in die Poren gedrückt wird, wobei das von der Probe aufgenommene Quecksilbervolumen in Abhängigkeit des Drucks erfasst wird. Der Porenradius  $R$  ist dabei indirekt proportional zum aufgewandten Druck. Für zylindrische Poren ist dieser Zusammenhang durch die *Washburn-Gleichung* [64] gegeben, wobei  $\vartheta$  den Benetzungswinkel (i.d.R.  $140^\circ$ ),  $p_{Hg}$  den Intrusionsdruck und  $\sigma$  die Oberflächenspannung des Quecksilbers darstellen:

$$\text{Gl. 3-14} \quad R = \frac{2\sigma \cos \vartheta}{p_{Hg}}$$

Die primär registrierte Druck-Volumenkurve wird als Quecksilber-Intrusionskurve bezeichnet, aus der nach Transformation der Druckwerte in Porenradien oder -durchmesser gemäß der *Washburn*-Gleichung (Gl. 3-14) die so genannte kumulative Porenvolumenverteilung gewonnen wird, deren Ableitung die differenzielle Porengrößenverteilung ergibt.

Aus der Intrusionskurve kann auch eine Porenwandflächen-Verteilung ermittelt werden. Die Gesamtoberfläche ergibt sich näherungsweise zu:

$$\text{Gl. 3-15} \quad A = \frac{1}{\gamma \cos \vartheta} \int_{V_{\text{Hg},0}}^{V_{\text{Hg},\text{max}}} p dV$$

Für die Anwendung von Gl. 3-15 ist kein Porenmodell notwendig, allerdings wird vorausgesetzt, dass keine sog. *Tintenfassporen* (engl. *ink-bottle pores*) vorhanden sind [65].

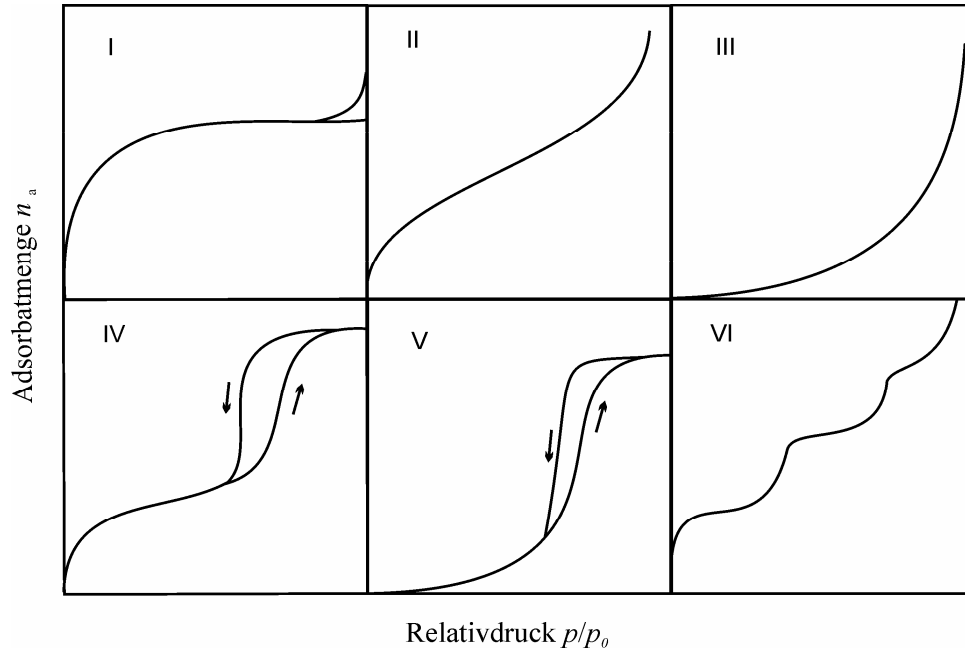
Die Quecksilberporosimetrie ist vor allem durch den sich von ungefähr 3.6 nm bis zu etwa 100 µm über mehrere Größenordnungen erstreckenden Bereich der erfassbaren Porenweiten gegenüber den anderen Porenbestimmungsverfahren nach wie vor konkurrenzlos. Sie ist aber nur für Stoffe anwendbar, die nicht mit Quecksilber reagieren (z. B. durch Amalgambildung). Einen weiteren Nachteil stellen die hohe Drücke von bis zu 4000 bar dar. Diese können bei weichen Materialien zu Deformationen führen, so dass falsche Ergebnisse erhalten werden.

### 3.4.2 Gasadsorptionsmessungen

Die zweite der am häufigsten angewendeten Porenbestimmungsmethoden beruht auf der Ausnutzung der schwachen physisorptiven Wechselwirkung von Inertgasen (Adsorptiven) wie Stickstoff, Argon oder Krypton mit Festkörperoberflächen, wobei der Feststoff in diesem Zusammenhang als Adsorbens bezeichnet wird. Hier wird zunächst eine Physisorptionsisotherme (adsorbierte Gasmenge als Funktion des Adsorptiv-Gleichgewichtsdrucks, vgl. Abb. 3-9) an dem zu charakterisierenden Material gemessen, was volumetrisch statisch erfolgen kann <sup>a-</sup>. Aus der Isotherme werden mittels geeigneter Auswerteverfahren, die immer von einer mathematischen Beschreibung der gesamten Adsorptionsisotherme oder eines Teilbereiches derselben ausgehen, die spezifische Oberfläche, das Porenvolumen sowie Aussagen über die Porengröße und Porengrößenverteilung gewonnen. Gegenüber der Hg-Porosimetrie ist die adsorptive Porenanalyse eine reversible, zerstörungsfreie Methode, deren obere Messgrenze bei etwa 100 nm liegt.

<sup>a-</sup> Zusätzlich existieren u.a. noch gravimetrische, kalorimetrische und spektroskopische Methoden sowie das sog. Trägergasverfahren (kontinuierlich und diskontinuierlich)

Wichtig ist, dass die Probe vor der Messung von allen adsorbierten Materialien – insbesondere Wasser – befreit wird. Dies erfolgt durch Entgasung im Vakuum ( $\sim 10^{-3}$  mbar) und – soweit möglich – bei erhöhten Temperaturen.



**Abb. 3-9:** Einteilung der Adsorptionsisothermen nach IUPAC: Typ I Mikroporöse Feststoffe; Typ II nicht-poröse oder makroporöse Adsorbentien; Typ III Polare Moleküle an unporösen hydrophoben Oberflächen (selten); Typ IV: Mesoporöse Feststoffe; Typ V: Mix aus III und IV (selten); Type VI: Schrittweise Mehrschichten-Adsorption auf gleichförmigen nicht-porösen Feststoffen (sehr selten) [66]

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche wendet man die BET-Methode nach *Brunauer, Emmett und Teller* (DIN 66131) an. Dabei wird die Menge an Adsorptiv bestimmt, die nötig ist um die Oberfläche der Probe mit einer Monoschicht zu belegen. Die ist mit Hilfe der BET-Gleichung möglich, wobei für Relativdrücke im Bereich von 0.05 und 0.3 eine Gerade erhalten wird, so dass aus Ordinatenabschnitt und Steigung die spezifische Monoschichtkapazität  $n_m$  (in  $\text{mol g}^{-1}$ ) bestimmt werden kann.

$$\text{Gl. 3-16} \quad \frac{p/p_0}{n_a(1-p/p_0)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{(C-1)}{n_m C} \cdot p/p_0 \quad \text{BET-Gleichung}$$

Dabei ist  $n_a$  die spezifische adsorbierte Menge ( $\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) und  $C$  die BET-Konstante. Da die Fläche, die ein adsorbiertes Stickstoffmolekül in einer Monoschicht einnimmt, bekannt ist [66], kann daraus wiederum die spezifische Oberfläche  $A_{\text{BET}}$  der Probe berechnet werden, wobei  $N_A$  der Avogadro Konstante und  $a$  der Fläche eines Moleküls in der Monoschicht ( $a_m(\text{N}_2) = 0.162 \text{ nm}^2$  bei 77K) entspricht:

$$\text{Gl. 3-17} \quad A_{\text{BET}} = n_m \cdot N_A \cdot a_m$$



Das Verfahren ist entsprechend einer IUPAC-Empfehlung [66] jedoch nur bei Adsorptionsisothermen vom Typ II und IV anwendbar. Die Charakterisierung von Mesoporen erfolgt mit Hilfe der *Kelvin*-Gleichung entsprechend der Methode nach *Barrett, Joyner* und *Halenda* (BJH) (DIN 66134). Dieses Verfahren zur Bestimmung von Mesoporen, d.h. Poren mit Durchmessern  $> 2$  nm, basiert auf der Annahme von Zylinderporen und ist u. a. in der DIN 66134 [67] beschrieben. Es beruht auf der Annahme, dass an den Porenwänden zunächst eine Adsorbatschicht aufwächst, zu der ab einem bestimmten Relativdruck  $p/p_0$  eine Flüssigphase durch spontane Porenkondensation hinzukommt. Der Radius der gefüllten Mesoporen ergibt sich durch Addition der Adsorbatschichtdicke  $t_a$  und dem Kelvinradius  $r_K$ , wobei letztere mit Hilfe der *Kelvin*-Gleichung bestimmt wird:

$$\text{Gl. 3-18} \quad \ln p/p_0 = -\frac{2\gamma V}{r_K RT} \cos \Theta$$

Für Stickstoff an dessen Siedepunkt kann die Gleichung in  $r_K = -0.953 \text{ nm} / (\ln p/p_0)$  umgeformt werden. Zur Bestimmung der Adsorbatschichtdicke  $t_a$  wurde eine Reihe von empirischen Gleichungen entwickelt, u. a. von *de Boer* [68] und *Halsey* [69], die einen direkten Zusammenhang zwischen Relativdruck und dem Wert für  $t$  liefern.

$$\text{Gl. 3-19} \quad t_a = 0.1 \text{ nm} \cdot \sqrt{\frac{13.99}{0.034 - 0.4343 \cdot \ln p/p_0}} \quad \text{de Boer Gleichung}$$

Für Poren kleiner 2 nm kann die Kelvin-Gleichung nicht mehr angewandt werden. In diesem Fall sind Wechselwirkungen mit benachbarten Porenwänden nicht mehr zu vernachlässigen. Zudem kann das kondensierte Adsorbat nicht mehr als Flüssigkeit mit makroskopischen thermodynamischen Eigenschaften angesehen werden.

### 3.4.3 Inverse Größenausschlusschromatographie (ISEC)

Mit den zuvor beschriebenen klassischen Methoden zur Charakterisierung poröser Systeme lassen sich nur trockene Feststoffe untersuchen. Es können deshalb häufig keinerlei Aussagen über deren Eigenschaften unter reale Bedingungen – z. B. bei der Chromatographie von (Bio-)Polymeren – gemacht werden. Es werden auch keinerlei Informationen über die Geschwindigkeit von Transportprozessen in porösen Systemen erhalten. Diese Probleme können mittels der inversen Größenausschlusschromatographie überwunden werden, die eine „dynamische Messmethode“ darstellt. Zudem ist es mit der ISEC möglich, auch relativ druckempfindliche Gele wie z. B. vernetzte Dextrane zu untersuchen. Insbesondere die Quecksilberporosimetrie liefert für solche Verbindungsklassen keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Da für die Größenausschlusschromatographie häufig Bezeichnungen wie SEC oder GPC (Gel-Permeationschromatographie) verwendet werden, haben sich für die inverse Größenausschlusschromatographie die Kurzbezeichnungen ISEC (vor allem im Englischen) bzw. IGPC durchgesetzt. Hierbei werden mit Hilfe von unterschiedlich großen Sondenmolekülen die Poren des Analyten nach ihrer Größe detektiert [70].

Das Messprinzip der ISEC ist relativ einfach: Mit dem zu charakterisierenden (Gel)-Material wird eine Chromatographiesäule gefüllt und in eine isokratische Chromatographie-Anlage – wie sie auch für die Standard-SEC verwendet wird – eingebaut. Durch Injizierung von engverteilten Polymerstandards mit bekanntem Molekulargewicht als Sondenmoleküle, in der Regel Pullulane bzw. Polystyrole, wird unter SEC-Bedingungen ein Verteilungskoeffizient  $K$  bestimmt:

$$\text{Gl. 3-20} \quad K = \frac{V_R - V_0}{V_i} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

Aus diesem Koeffizienten kann anschließend, sofern ein Zusammenhang zwischen Molmasse und hydrodynamischen Radius der Sondenmoleküle im verwendeten Lösungsmittel bekannt ist, die Porengrößenverteilung berechnet werden. Entscheidend ist jedoch, wie auch bei der konventionellen SEC, dass keine chemischen Wechselwirkungen zwischen untersuchten Materialien und Analyten auftreten.

Die Berechnungsalgorithmen des verwendeten Programms (PoroCheck von Polymer Standard Service, Mainz) nach einer molekular-statistischen Theorie beruhen in erster Linie auf den Arbeiten von *Gorbunov* und *Casassa*. Die Grundlagen der Methode sind u. a. in einem ausführlichen Review-Artikel beschrieben worden [71]. Im Folgenden soll hier kurz der theoretische Hintergrund der Methode zusammengefasst werden. Für die transversale Porendimension wird der Parameter  $R$  definiert:

$$\text{Gl. 3-21} \quad R \equiv \frac{2 \cdot V}{S}$$

wobei  $V$  das Porenvolumen und  $S$  die Porenoberfläche repräsentiert. Je nach angewandtem Modell entspricht  $R$  der halben Porenweite beim Schlitzporenmodell (Modell der parallelen Platten, engl. *slit-like model*) bzw. dem Porenradius beim zylindrischen Modell (*cylindrical model*).

Die Theorie der inversen SEC basiert auf dem Zusammenhang des Verteilungskoeffizienten  $K_{PSD}$  und der volumenbasierenden Porengrößenverteilung  $\phi_v(R)$

$$\text{Gl. 3-22} \quad K(r) = K_{PSD}(r) = \int K_0(r/R) \phi_v(R) dR$$

wobei  $K_0(r/R)$  dem Verteilungskoeffizienten für ein Makromolekül mit dem Gyrationradius  $r$  in einer Pore mit einer transversalen Dimension von  $R$  entspricht. Für viele Polymer-Lösungsmittel-Systeme ist ein Zusammenhang zwischen Radius und Molmasse in Form von  $r = K \cdot M^\alpha$  bekannt. Aus der *Casassa*-Theorie [72,73,74] erhält man unter Annahme von makromolekularen idealen Zufalls-Knäueln und zylindrischen Poren die Kernel-Funktion  $K_0(r/R)$ :

$$\text{Gl. 3-23} \quad K_0(r/R) = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{4}{\beta_m^2} \exp\left[-(\beta_m r/R)^2\right]$$

mit  $\beta_m$  als m-te Wurzel der Besselfunktion  $J_0(\beta)$ . Für Schlitzporen hingegen gilt:

$$\text{Gl. 3-24} \quad K_0(r/R) = \sum_{(odd)m=1}^{\infty} 8(\pi m)^{-2} \exp\left[-(\pi m r/R)^2\right]$$

Hiermit werden zunächst eine Verteilungsfunktion in Form einer logarithmischen Normalverteilung angenommen und die gesuchten Parameter  $R$  und  $\sigma$  mit der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Hieraus wiederum können weitere Parameter wie mittlerer Porendurchmesser, Oberfläche und Porenvolumen bestimmt werden. Entsprechend den Angaben der Software-Entwickler ist die Methode anwendbar für Partikel mit Porenweiten zwischen 0.5 und 600 nm.

#### 3.4.4 Röntgenkleinwinkelstreuung an porösen Systemen

Mit Hilfe von SAXS-Messungen ist die Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Nanostrukturen möglich, vorausgesetzt dass deren Phasen-Grenzflächen deutlich von einander abgegrenzt sind, d.h. die Übergänge der Elektronendichten innerhalb des zu untersuchenden Materials müssen durch Stufenfunktionen beschrieben werden können. Dies ist typisch im Falle von porösen Materialien. Die Theorie hierfür wurde ursprünglich von *Porod* [75,76] entwickelt. Es zeigt sich, dass die Oberfläche pro Volumeneinheit  $S/V$  eines Materials in direkter Beziehung zur sog. mittleren Durchschusslänge (engl. average cord-length)  $l_p$  – die auch als Porod-Länge bezeichnet wird – steht:

$$\text{Gl. 3-25} \quad \frac{S}{V} = \frac{4\phi(1-\phi)}{l_p},$$

Dabei stellt  $\phi$  die Volumenfraktion der ersten Phase (Poren) und  $1 - \phi$  die Volumenfraktion der zweiten Phase (Wände) dar. Zuletzt wurde das Konzept der Durchschusslängenverteilung von Smarsly wesentlich erweitert [77]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jedoch die ursprüngliche und etablierte *Porod*-Methode verwendet.

Bei Verwendung einer Kratky-Kamera mit Spalt-Focus-System – das für diese Arbeit verwendete SAXSess-System ist von diesem Typ – ist es von Vorteil, dass die SAXS-Daten vor der Durchführung der Porengrößenanalyse nicht entfaltet werden müssen. Anstatt entfaltete Daten zu verwenden, erfolgt die Auswertung direkt und mit höherer Präzision mit den nicht-entfalteten Spalt-Längen-Daten. Der Grund hierfür ist der, dass mit einem Spalt-System die Integration eindimensional im reziproken Raum erfolgt. Mit anderen Worten, aus dem asymptotischen Verhalten  $I(q)$  proportional zu  $q^{-4}$  bei hohen  $q$ -Werten mit Lochblende wird  $J(q)$  proportional zu  $q^{-3}$  beim Spalt-Focus-System. Um Missverständnisse zu vermeiden, werden verschiedene Bezeichnungen für die gemessenen Streuintensitäten eingeführt: Bei der Lochblende (d.h. mit entfaltenen Daten) wird  $I(q)$  verwendet, beim Spalt-Focus-System  $J(q)$ . Bei der Spalt-Focus-Blende ist zu beachten, dass der Ausdruck für die Bestimmung von  $l_p$  geringfügig anders ist als der für das Lochblenden-System. Für den Spalt-Focus gilt

$$\text{Gl. 3-26} \quad \frac{1}{l_p} = \frac{K_L}{Q_L},$$

wobei der Zähler den auch als Porod-Konstante bezeichneten asymptotischen Wert darstellt:

$$\text{Gl. 3-27} \quad K_L = \lim_{q \rightarrow \infty} q^3 J(q)$$

In anderen Worten,  $K_L$  ist der Faktor der  $q^{-3}$  Skalierung der Streuintensität des Grenzwertes bei hohen  $q$ -Werten und ist direkt proportional zur spezifischen Oberfläche. Die in der Regel konstante Hintergrundstreuung, welche aus der Dichtefluktuations resultiert [78], muss noch abgezogen werden, bevor  $K_L$  bestimmt werden kann. Die Porod-Konstante wird mit Hilfe einer  $q^3 J(q)$ - $q$ -Auftragung bestimmt. Es ist zu beachten, dass diese sehr empfindlich gegenüber Fehlern beim Abzug parasitärer Streuung ist.

Der Nenner von Gl. 3-26 – auch als Porod-Invariante bezeichnet – wird durch numerische Integration bestimmt:

$$\text{Gl. 3-28} \quad Q_L = \int_0^{\infty} q J(q) dq$$

Es muss berücksichtigt werden, dass die Streuintensitäten experimentell nur zwischen einem unteren  $q_{\min}$ - und einem oberen  $q_{\max}$ -Wert zugänglich sind. Um die Invariante so präzise wie möglich berechnen zu können, müssen Näherungswerte für die Bereiche unterhalb  $q_{\min}$  und oberhalb  $q_{\max}$  verwendet werden. Dies führt zu folgender Gleichung:

$$\text{Gl. 3-29} \quad Q_p = \frac{1}{2} q_{\min}^2 J(q_{\min}) + \int_{q_{\min}}^{q_{\max}} q J(q) dq + q_{\max}^{-1} K_L$$

Es konnte gezeigt werden, dass diese Extrapolationen für eine genaue Bestimmung der Invarianten von großer Bedeutung sind [78].

Die Berechnung der Porengrößenverteilung mit Hilfe der IFT-Methode benötigt kein Modell für die Art der Verteilung. Um die Porengrößenverteilungen mit Hilfe einer direkten Modellanpassung der SAXS-Kurven vergleichen zu können, wurde eine bimodale *Schulz-Zimm*-Verteilung verwendet. Diese ist gegeben als

$$\text{Gl. 3-30} \quad f(R) = \frac{(z+1)^{z+1} R^z}{\Gamma(z+1) R_m^{z+1}} \exp \left[ -(z+1) \frac{R}{R_m} \right]$$

mit einem mittleren Radius  $R_m$  und einer relativen Standardabweichung von  $\sigma = (z+1)^{-1/2}$ . Der  $n^{\text{te}}$  - Grad der Verteilung ist gleich

$$\text{Gl. 3-31} \quad \langle R^n \rangle = \frac{(z+n)!}{(z+1)^n z!} R_m^n$$

Der Formfaktor einer Pore wird durch das mittlere Volumen normiert, wobei das dritte Moment von  $R$  verwendet wird

$$\text{Gl. 3-32} \quad \langle V \rangle = \frac{4\pi}{3} \langle R^3 \rangle = \frac{4\pi}{3} \frac{(z+3)(z+2)}{(z+1)^2} R_m^3$$

Die Streuintensität einer bimodalen Größenverteilung ist somit gegeben als

$$\text{Gl. 3-33} \quad I(q) \sim (\rho_{\text{Pore}} - \rho_{\text{Cellulose}})^2 \left[ \frac{N_1}{\langle V_1 \rangle} \int_0^\infty f(R_1) R^6 F^2(qR_1) dR + \frac{N_2}{\langle V_2 \rangle} \int_0^\infty f(R_2) R^6 F^2(qR_2) dR \right]$$

wobei  $F(x) = x^{-3} [\sin(x) - x \cos(x)]$  die Streuamplitude einer Kugel darstellt. Das Streusignal der Poren ist messbar, falls diese entweder mit Luft (d.h. trocken) oder mit Wasser (d.h. feucht) gefüllt sind und sofern der Wert von  $(\rho_{\text{Pore}} - \rho_{\text{Cellulose}})^2$  nicht zu nahe bei null liegt. In aller Regel kann die Größenverteilung der großen Poren  $f_1(R)$  sowie der kleinen Poren  $f_2(R)$  bestimmt werden. Darüber hinaus ist das Volumenverhältnis der großen gegenüber den kleinen Poren gegeben als  $N_1/N_2$ .

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Auswahl der eingesetzten Materialien

#### 4.1.1 Perlcellulose

Um zu gewährleisten, dass bei allen Arbeiten Materialien mit derselben Qualität und denselben chemischen und physikalischen Eigenschaften eingesetzt werden, wurde eine größere Menge kommerziell erhältlicher Perlcellulose eingekauft. Die Eigenschaften laut Hersteller sind in Tab. 4-1 dargestellt.

**Tab. 4-1:** Produktdaten für Perlcellulosen Perloza MT50 und MT100 der Firma Iontosorb

Produkt	Partikelgröße	Bettvolumen	Ausschlussgrenze	Trennbereich
	$D$	$V_B$	$M_{w,Proteine}$	$M_{w,Proteine}$
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\text{ml g}^{-1}_{\text{trocken}}$ ]	[ $\text{g mol}^{-1}$ ]	[ $\text{g mol}^{-1}$ ]
<b>Perloza MT50</b>	30 - 50	3.8	100 000	20 000 – 70 000
<b>Perloza MT100</b>	30 - 50	9.5	2 000 000	30 000 – 100 000

#### 4.1.2 Referenzmaterialien für die Größenausschlusschromatographie (SEC)

Ein Referenzmaterial kann als ein Stoff (oder eine Substanz) definiert werden, dessen Eigenschaften ausreichend homogen und so genau festgelegt sind, dass er zum Kalibrieren von Geräten, zur Bewertung von Methoden oder zur Zuordnung von Messgrößen zu Stoffen verwendet werden kann [79].

Zur Charakterisierung der Chromatographiesäulen werden somit Materialien mit genau definiertem Eigenschaftsprofil benötigt. Grundlegende Voraussetzungen sind eine gute Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln, eine ausreichende Stabilität, eine genau definierte Struktur sowie einer guten Detektierbarkeit (u. a. hohes Brechungsindexinkrement  $dn/dc$ ). Die wichtigsten Parameter für den Einsatz als SEC-Standard sind jedoch exakt definierte Molmassen sowie enge Molmassenverteilungen. Für eine genaue Kalibrierung bzw. Charakterisierung von SEC-Säulen ist zudem wichtig, dass die vorhandenen Standardmaterialien ein breites Spektrum an Molmassen über mehrere Größenordnungen abdecken. Zudem sollten sie leicht verfügbar und „relativ“ preisgünstig sein.

Zum Einen werden engverteilte Pullulan-Referenzmaterialien der Firma Polymer Standard Services (PSS; Mainz) eingesetzt. Die Polydispersitätsindizes ( $PD = M_w/M_n$ ) der Standards sind laut Herstellerangaben kleiner als 1.30. Diese aus D-Glucose-Monomereinheiten aufgebauten Polysaccharide zeigen in der Regel mit Cellulose sowie den meisten kommerziell erhältlichen

SEC-Säulen für wässrige Lösungsmittelsysteme keine nennenswerten Wechselwirkungen und werden deshalb häufig zur Kalibrierung eingesetzt. Ein Vorteil von Pullulan gegenüber dem in der SEC ebenfalls häufig verwendeten – jedoch preiswerteren – Dextran ist, dass es keinerlei Verzweigungen aufweist und somit eine besser definierte Struktur besitzt <sup>-a-</sup>.

**Tab. 4-2:** Eigenschaften der Polysaccharid-Referenzmaterialien für die SEC. Die Molmassen und Polydispersitäten sind jeweils Herstellerangaben. Grenzviskositäten wurden durch SEC-Messungen mittels Viskositätsdetektor gemessen; Bestimmung der Viskositätsradien  $r_\eta$  von Pullulan nach Gl. 4-1 unter Verwendung der Grenzviskosität; Trägheitsradien  $r_g$  mit MALLS-Detektion wobei die Werte für  $M < 10^5$  durch Extrapolation erhalten wurden ( $dn/dc$ : 0.147; Eluent: 0.2 M NaNO<sub>3</sub>/ Phosphatpuffer 0.01 M pH 6.5). Stokes-Radien  $r_s$  wurden mit der DLS bestimmt (Werte für  $M < 5 \cdot 10^3$  durch Extrapolation)

Probe	$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_p$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$PD$ [-]	$[\eta]$ [ml g <sup>-1</sup> ]	$r_g$ [nm]	$r_\eta$ [nm]	$r_s$ [nm]
Pullulan 180 D (Glucose)	180	180	1.00	0.68	0.24	0.27	0.42
Pullulan 342 D	342	342	1.00	1.04	0.36	0.38	0.57
Pullulan 830 D	1080	830	1.19	2.21	0.61	0.72	1.02
Pullulan 5.6 kD	$5.90 \cdot 10^3$	$5.60 \cdot 10^3$	1.09	10.2	1.91	2.12	2.45
Pullulan 11.2 kD	$1.18 \cdot 10^4$	$1.12 \cdot 10^4$	1.10	12.6	2.89	2.87	3.40
Pullulan 22.0 kD	$2.28 \cdot 10^4$	$2.20 \cdot 10^4$	1.07	18.8	4.32	4.08	4.55
Pullulan 45.9 kD	$4.73 \cdot 10^4$	$4.59 \cdot 10^4$	1.06	29.0	6.71	6.01	6.75
Pullulan 106 kD	$1.12 \cdot 10^5$	$1.06 \cdot 10^5$	1.12	53.8	10.8	9.85	10.6
Pullulan 200 kD	$2.12 \cdot 10^5$	$2.00 \cdot 10^5$	1.13	81.6	15.7	14.0	14.4
Pullulan 380 kD	$4.04 \cdot 10^5$	$3.80 \cdot 10^5$	1.13	134	24.9	20.5	20.9
Pullulan 710 kD	$7.88 \cdot 10^5$	$7.10 \cdot 10^5$	1.23	200	37.4	29.2	29.1
Pullulan 1540 kD	$1.66 \cdot 10^6$	$1.54 \cdot 10^6$	1.17	289	51.0	42.4	38.8

Die angegebenen Grenzviskositäten  $[\eta]$  der Pullulane in Tab. 4-2 wurden mit der SEC unter Verwendung eines Online-Viskositätsdetektors bestimmt. Die daraus bestimmten *Kuhn-Mark-Houwink*-Parameter sind  $K_{KM\text{H}} = 0.0225$  und  $a = 0.670$ . Entsprechend der *Durchspülungstheorie* besitzt der Exponent  $a$  für undurchspülte Polymerknäuel im ungestörten Zustand – d.h. in einem theta-Lösungsmittel – einen Wert von 0.5. Bei einem komplett durchspülten Knäuel liegt dieser bei  $a = 1$  [56]. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Pullulan unter den angegebenen Bedingungen um ein schwach aufgeweitetes Knäuel handelt.

<sup>-a-</sup> Pullulan wird von dem Pilz *Aureobasidium pullulans* aus Stärke gebildet. Das lineare Polysaccharid besteht aus 1,6- verknüpften Maltotriose-Einheiten, die wiederum aus jeweils 1,4- verknüpften Glucoseresten aufgebaut sind.

**Tab. 4-3:** Eigenschaften von Protein-Referenzmaterialien für die SEC. Die Molmassen und hydrodynamischen Radien ( $r_s$ : Stokes-Radius) sind soweit nicht anders gekennzeichnet Herstellerangaben. pI: Isoelektrischer Punkt

Probe	Herkunft	$M$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$r_s$ [nm]	$[\eta]$ [ml g <sup>-1</sup> ]	pI [-]
$\beta$ -Alanin		89	--	--	6.0
Aprotinin	Rinderlunge	$6.50 \cdot 10^3$	1.43		9.1
Ribonuclease A	Rinderpankreas	$1.37 \cdot 10^4$	1.64	3.3[80]	9.3
Chymotrypsinogen A	Rinderpankreas	$2.50 \cdot 10^4$	2.09	2.5[80]	9.2-9.6
Carbonic anhydrase	Rindererythrozyten	$2.90 \cdot 10^4$	2.55[81]		5.9
Ovalbumin	Hühnereier	$4.30 \cdot 10^4$	3.05	4.0[80]	4.7
Albumin	Rinderserum	$6.70 \cdot 10^4$	3.55	3.7[80]	4.7-4.9
Conalbumin	Hühnereiweiß	$7.50 \cdot 10^4$	4.04[81]		5.9
Aldolase	Kaninchenmuskel	$1.71 \cdot 10^5$	4.81	4.5[80]	6.1
Catalase	Rinderleber	$2.32 \cdot 10^5$	5.22	3.9[80]	5.4
Ferritin	Pferdemilz	$4.40 \cdot 10^5$	6.10		4.6-5.0
Thyroglobulin	Rinderschilddrüse	$6.69 \cdot 10^5$	8.50	4.7[80]	4.5
Fibrinogen	Rinderplasma	$3.40 \cdot 10^5$	10.70	20.4[82]	5.1

Für die Pullulane sind die Viskositätsradien  $r_\eta$  – d.h. der äquivalente Kugelradius des Polymerknäuels – angegeben, die mit Hilfe der Formel

$$\text{Gl. 4-1} \quad r_\eta = \left( \frac{3[\eta]M_w}{10\pi \cdot N_A} \right)^{1/3} \cdot 10^7 \quad \text{mit } N_A: \text{Avogadro-Konstante}$$

unter Verwendung der gewichtsmittleren Molmasse  $M_w$  und der Grenzviskosität  $[\eta]$  berechnet wurden [83]. Die Trägheitsradien  $r_g$  der Pullulan-Standards wurden mit Hilfe eines MALLS-Detektors bestimmt. Für das Brechungsindexinkrement  $dn/dc$  wurde ein Wert von  $0.147 \text{ ml g}^{-1}$  verwendet. Da eine Bestimmung von  $r_g$  nur bei anisotropen Streuern – d.h. bei Molekülen die groß genug sind, um eine Winkelabhängigkeit der Streuintensität zu zeigen – möglich ist, konnte  $r_g$  nur für Pullulan mit einer Molmasse  $> 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  bestimmt werden. Die Unsicherheit ist dabei stark von der Molmasse abhängig. Bei einer Molmasse von  $1.66 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  liegt diese bei einem Wert von 1.6 %, für Pullulan mit einer Molmasse von  $2.00 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  liegt die Unsicherheit schon bei 18 %. Die  $r_g$ -Werte der niedermolekularen Standards wurden durch Extrapolation der Messwerte berechnet <sup>-a-</sup>. Zusätzlich konnten mit DLS-Untersuchungen die Stokes-Radien  $r_s$  bestimmt werden. Auch in diesem Fall wurden die Werte für Polymere mit Molmassen kleiner  $5\,000 \text{ g mol}^{-1}$  auf Grund der zunehmenden

<sup>-a-</sup> Anpassung der Messwerte mit  $\log r_g = (0.598 \pm 0.034) \log M_p - (1.960 \pm 0.192)$ ;  $R^2 = 0.9870$



Ungenauigkeit der Methode durch eine Extrapolation der Messreihe bestimmt <sup>-a-</sup>. Nach *Elias* [56] sind bei linearen Knäuelmolekülen für die Quotienten  $r_s/r_\eta$  und  $r_g/r_s$  Werte von 1.07 bzw. 1.28 zu erwarten. Berechnet man für die tatsächlich gemessenen Radien die Quotienten, so erhält man für  $r_s/r_\eta$  einen Wert von 1.07 (für  $M_w > 5\,000\text{ g mol}^{-1}$ ) und für  $r_g/r_s$  einen Wert von 1.18 (für  $M_w > 10^5\text{ g mol}^{-1}$ ), was eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten bedeutet. Es werden zudem Protein-Kalibrations-Kits verwendet (Tab. 4-3). Die Proteine besitzen Molmassen zwischen 6 500 und 669 000  $\text{g mol}^{-1}$ . Der isoelektrische Punkt der Standards deckt ein Spektrum zwischen pH 4.7 und 9.6 ab. Als niedermolekularer Marker wurde die Aminosäure  $\beta$ -Alanin mit einem isoelektrischen Punkt von 6.0 ausgewählt. Die in Tab. 4-3 angegebenen hydrodynamischen Radien (bzw. Stokes-Radien)  $r_s$  der Proteine sind Herstellerangaben, die intrinsischen Viskositäten  $[\eta]$  der Proteine Literaturwerte.

---

<sup>-a-</sup> Anpassung der Messwerte mit  $\log r_s = (0.515 \pm 0.008) \log M_p - (1.563 \pm 0.041)$ ;  $R^2 = 0.9985$

## 4.2 *Charakterisierung der Perlcellulosen*

### 4.2.1 *Trocknung der Perlcellulose*

Eine Reihe von Analysemethoden, u. a. die Quecksilberporosimetrie und die Gasadsorption können nur an getrockneten, möglichst wasserfreien Proben durchgeführt werden. Zudem sollen bei der Modifizierung der Perlcellulosen polymeranaloge Umsetzungen angewandt werden, die häufig nur in wasserfreiem Medium durchgeführt werden können. Deshalb ist eine Trocknung der Perlcellulosen für eine Reihe von Untersuchungsmethoden und Prozessschritten unumgänglich.

Bei der Trocknung ist darauf zu achten, dass durch den Trocknungs-Prozess die empfindliche Porenstruktur der Celluloseperlen so wenig wie möglich gestört wird. Hier kommen zum Einen die Gefriertrocknung und zum Anderen der Lösungsmittelaustausch in Frage. Bei der Gefriertrocknung wird eine Suspension aus Wasser und Celluloseperlen mit Hilfe einer Ethanol-Trockeneismischung eingefroren. Anschließend sublimiert man das Wasser durch Anlegen eines Vakuums ( $\sim 0.37$  mbar). Vorteil dieser Methode ist der geringe Arbeitsaufwand, moderne Anlagen funktionieren in der Regel vollautomatisch.

Beim Lösungsmittelaustausch werden die Celluloseperlen in Wasser dispergiert. Anschließend wird schrittweise von Wasser auf hydrophobere Lösungsmittel oder Lösungsmittelmischungen umgestellt. Das zuletzt verwendete Lösungsmittel sollte in jedem Fall leichtflüchtig sein. Von den Perlcellulosen Perloza MT50 und MT100 wurden jeweils Proben sowohl mit der Gefriertrocknung als auch via Lösungsmittelaustausch getrocknet. Für die letztere Methode wurden als Trocknungsmedien Wasser, Ethanol und Diethylether verwendet.

### 4.2.2 *Lichtmikroskopie*

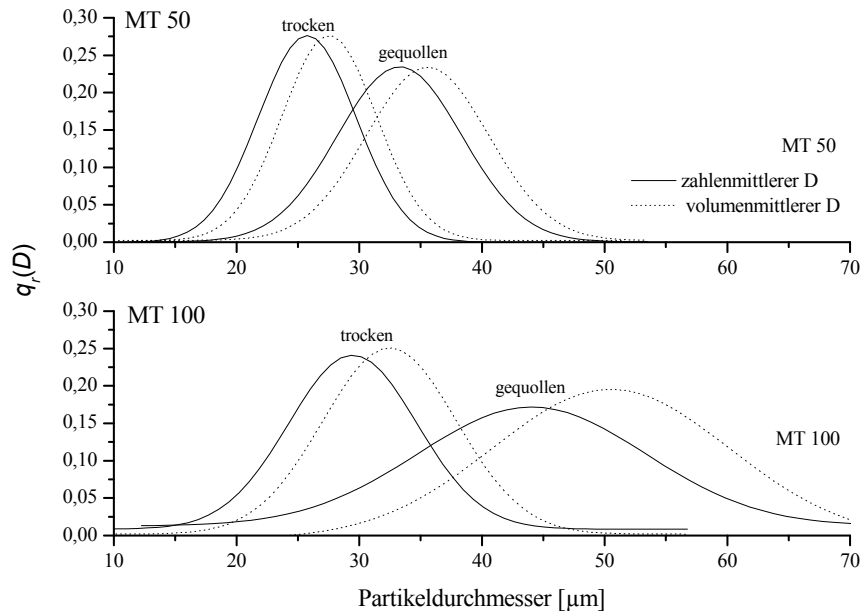
Die Bestimmung der (mittleren) Partikelgröße erfolgte durch ein optisches Mikroskop. Hierzu wurde von beiden Perlcellulose-Typen in gequollenem und getrocknetem Zustand jeweils eine Reihe von Aufnahmen aufgezeichnet. Mit Hilfe einer speziellen Bildbearbeitungssoftware wurden die Durchmesser der einzelnen Partikel bestimmt. Je Probe wurden dabei mindestens 500 Partikel vermessen (vgl. Tab. 4-4). Die Auswertung erfolgte auf zwei Arten. Zum Einen wurde eine statistische Analyse mit Hilfe des Programms OriginPRO (Version 7.5) durchgeführt (Spaltenstatistik), wobei Mittelwert und Standardabweichung der Partikeldurchmesser bestimmt wurden.

**Tab. 4-4:** Ergebnisse der Partikelgrößen-Charakterisierung mittels Lichtmikroskopie. Eine Quantifizierung der Größenverteilung erfolgt mit Hilfe des Parameters  $D_V/D_N$ . Trocknung der Celluloseperlen erfolgte durch Lösungsmittelaustausch (Wasser → Ethanol → Diethylether).

	Statistik					Histogramm Verteilung (Gauss-Kurvenanpassung)							
	$n$	$D$	$\sigma$	$D_{max}$	$D_{min}$	$N$	$D_N$	$\sigma_N$	$D_V$	$\sigma_V$	$D_V/D_N$	$S_D$	$S_V$
		[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]		[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]		[%]	[%]
<b>MT50<sup>-a-</sup></b>	507	33.6	5.3	53.1	11.2	15	33.3	10.2	35.6	10.0	1.07		
<b>MT50 LMA<sup>-b-</sup></b>	999	25.9	4.2	52.7	9.2	16	25.8	8.0	27.6	7.7	1.07	23	54
<b>MT100<sup>-a-</sup></b>	507	42.6	11.3	70.5	10.2	14	44.1	18.6	50.5	19.3	1.15		
<b>MT100 LMA<sup>-b-</sup></b>	530	28.7	6.9	55.4	7.1	15	29.5	10.5	32.5	10.9	1.10	36	73
<sup>-a-</sup> feucht	<sup>b-</sup> trocken (Lösungsmittelaustausch)												
$n$	Anzahl der Untersuchten Partikel												
$D$	mittlerer Partikeldurchmesser (Arithmetisches Mittel)												
$\sigma$	Standardabweichung												
$D_{max}$	Maximaler Partikeldurchmesser												
$D_{min}$	Minimaler Partikeldurchmesser												
$N$	Anzahl der Histogrammbalken ( $N=5 \cdot \log(n)+1$ )												
$D_N$	anzahlgemittelter Partikeldurchmesser												
$D_V$	volumengemittelter Partikeldurchmesser												
$\sigma_N$	Standardabweichung (Gauß'sche Normalverteilung; Zahlenmittel)												
$\sigma_V$	Standardabweichung (Gauß'sche Normalverteilung; Volumenmittel)												
$S_D$	Schrumpfung der Partikeldurchmesser während Trocknung (aus $D_N$ )												
$S_V$	Schrumpfung des Partikelvolumens während Trocknung (aus $D_V$ )												

Des Weiteren wurde eine Histogrammanalyse durchgeführt. Die jeweilige Balkenanzahl  $N$  je Histogramm wurde mit der Formel  $N = 1 + 5 \log(n)$  - einer Modifizierung der Sturges'schen Regel [84] - berechnet, wobei  $n$  der Anzahl der untersuchten Partikel entspricht. Mit dieser Methode lässt sich sehr einfach die optimale Klassenbreite eines Histogramms bestimmen. Anschließend wurden die erhaltenen Histogramm-Kurven durch Gauß-Kurven angepasst. Die Auswertung erfolgte zum Einen bezogen auf den Partikeldurchmesser, so dass ein zahlenmittlerer Durchmesser  $D_N$  erhalten wurde. Alternativ wurde die Auswertung bezogen auf das Partikelvolumen durchgeführt. Es wurde dabei angenommen, dass alle Partikel Kugelform besitzen. So wurde ein volumen-mittlerer Durchmesser  $D_V$  erhalten. Der Quotient  $D_V/D_N$  dient zur Quantifizierung der Partikelgrößenverteilung, vergleichbar dem Polydispersitätsindex DP in der Polymeranalytik.

Aus den zahlenmittleren Durchmessern  $D_N$  und den volumenmittleren Durchmessern  $D_V$  wurde zudem für beide Partikelsorten sowohl die mittlere Schrumpfung des Durchmessers (aus  $D_N$ ) als auch die Schrumpfung des Partikelvolumens bestimmt.



**Abb. 4-1:** Partikelgrößenverteilungen der Perlcellulosen Perloza MT50 und MT100 in gequollenem und trockenem Zustand. Die Kurven wurden mit Gauß'schen Normalverteilungen angepasst. Die gepunkteten Kurven stellen die volumengemittelten Werte dar, die durchgezogenen die anzahlgemittelten Werte.

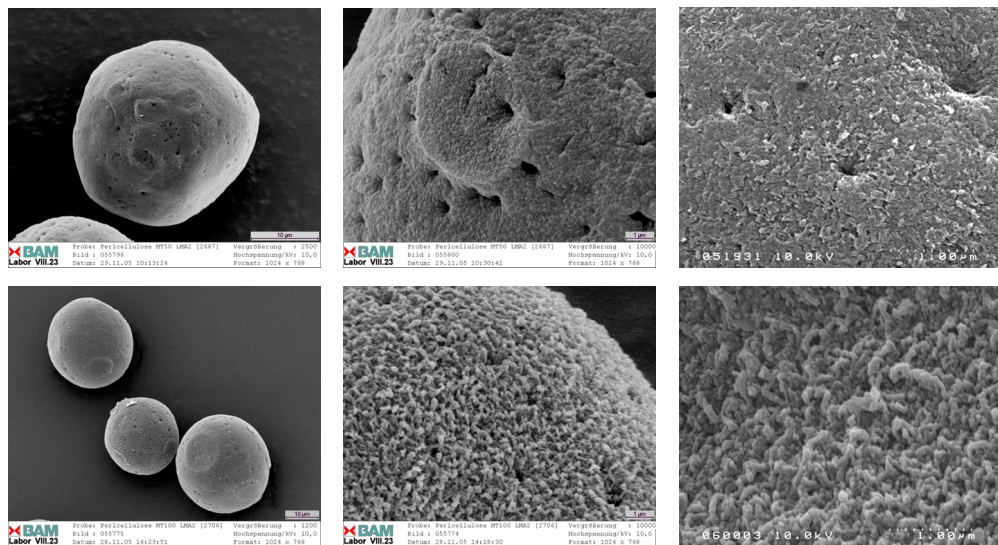
In Abb. 4-1 ist die Partikelgrößenverteilung graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass MT50 eine engere Größenverteilung besitzt und dass die Unterschiede zwischen gequollenem und getrocknetem Zustand bei MT50 geringer sind.

#### 4.2.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Probenpräparation für die REM-Aufnahmen erfolgte durch Fixierung der Celluloseperlen auf Kohle-Tabletten und anschließender Goldbeschichtung. Es wurden Aufnahmen von den beiden Perlcellulosen Perloza MT50 und MT100 im Bereich von 1 000 bis 30 000facher Vergrößerung erstellt.

Bei einer 1 000 bis 2 500fachen Vergrößerung (Abb. 4-2 linke Seite) sind lediglich geringe Unterschiede zwischen den beiden Perlcellulosen zu erkennen. Beide weisen eine relativ glatte Oberfläche auf. Deutlich sichtbar sind jedoch, insbesondere bei Perloza MT50, eine Reihe von Makroporen mit Durchmessern im Bereich von 0.5 – 1.0 µm. Dabei handelt es sich vermutlich um Transportkanäle, die ins Innere der Partikel führen.

In der mittleren und höchsten Vergrößerungsstufe, d.h. bei 10 000facher bzw. 30 000facher Vergrößerung ist jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Perlcellulose-Typen zu erkennen (Abb. 4-2 rechte Seite). Die Perlcellulose MT100 weist eine rauere, schwammartige Oberfläche auf, wobei eine Porenstruktur sehr gut zu sehen ist. Die Oberfläche der Perlcellulose MT50 hingegen ist glatter und zeigt nur einige größere Makroporen.



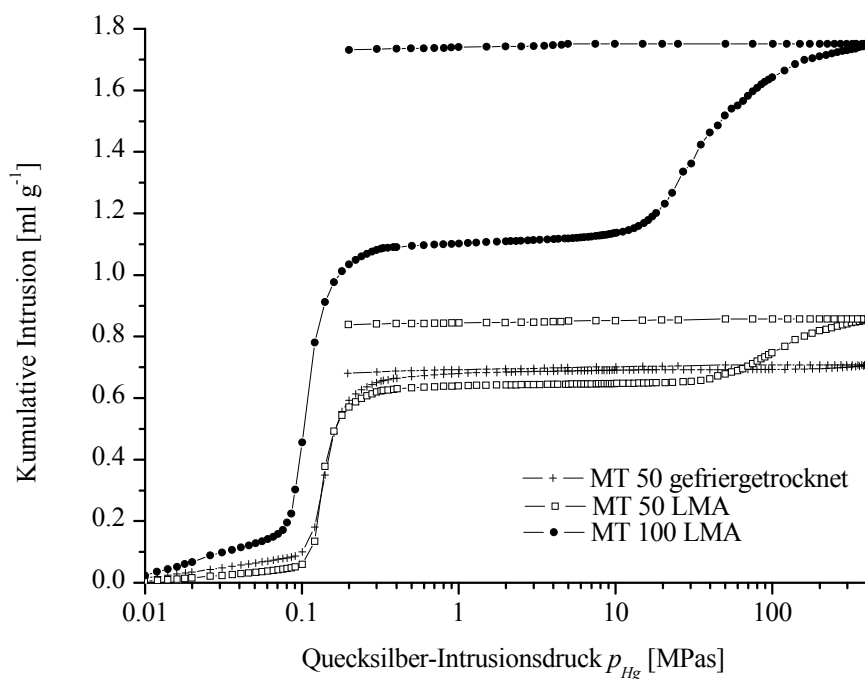
**Abb. 4-2:** REM-Aufnahmen von Perlcellulose Perloza MT50 (oben) und MT100 (unten); Vergrößerung: links Oben 1 000, links Unten 2 500; Mitte 10 000; rechts 30 000.

#### 4.2.4 Quecksilberporosimetrie und Gasadsorptionsmessungen

Zur Charakterisierung der getrockneten Perlcellulosen wurden neben der Elektronenmikroskopie auch die Quecksilberporosimetrie sowie Gasadsorptionsmessungen eingesetzt. Als physikalische Größen wurden u. a. die spezifische Oberfläche, die Porenweite und das spezifische Porenvolumen ermittelt. Zusätzlich wurde die Reindichte, d.h. die sog. Skelett-Dichte der Cellulose mit einem Helium-Pyknometer bestimmt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass so gut wie keine abgeschlossenen, d.h. für Gase unzugänglichen Poren vorliegen.

Bei der Quecksilberporosimetrie werden die Proben jeweils zunächst mit einem Niederdruckporosimeter untersucht (Druckbereich: schwaches Vakuum → 4 bar), anschließend erfolgt die Messung an einer Hochdruck-Messstation mit Drücken bis 4000 bar, was einem Porendurchmesser von 3.6 nm entspricht.

Es wurden mittels Lösungsmittelaustausch getrocknete Proben von MT50 und MT100, sowie eine mittels Gefriertrocknung getrocknete MT50 untersucht. Die Quecksilber-Intrusionskurven sind in Abb. 4-3 dargestellt. Zu sehen ist zunächst für alle Proben ein steiler Anstieg der Intrusion im Bereich niedriger Drücke, d.h. 0.14 MPa bei MT50 und 0.10 MPa bei MT100. Der Kurvenverlauf für die beiden MT50 - Proben ist bis zu einem Druck von ca. 0.2 MPa nahezu identisch. Der steile Anstieg im Niederdruckbereich ist auf die Füllung des Zwischenkornvolumens zurückzuführen. Für MT50 ergeben sich mit  $9.9\ \mu\text{m}$  etwas niedrigere Werte als für MT100 mit  $11\ \mu\text{m}$ . Dies ist darauf zurückzuführen, dass MT100 einen größeren mittleren Partikeldurchmesser besitzt und somit größere Hohlräume zwischen den einzelnen Partikeln auftreten.



**Abb. 4-3:** Quecksilberintrusionskurven für Perlcellulose MT50 und MT100; LMA: getrocknet mit Lösungsmittelaustausch.

Des Weiteren fällt auf, dass MT100 mit  $0.64\ \text{ml g}^{-1}$  ein deutlich höheres spezifisches Porenvolumen besitzt als MT50 mit  $0.20\ \text{ml g}^{-1}$ , wodurch auch die niedrigere spezifische Oberfläche der MT50 Cellulose erklärt werden kann. Die gefriergetrocknete Probe hingegen besitzt nur ein minimales Porenvolumen von  $0.01\ \text{ml g}^{-1}$ , was einer Porosität von weniger als 2% entspricht<sup>-a-</sup>. Erklären lässt sich dies mit einem nahezu vollständigen Kollaps aller Poren während der Gefriertrocknung.

<sup>-a-</sup> Es wurde angenommen, dass die Reindichte der gefriergetrockneten Cellulose identisch mit der durch Lösungsmittelaustausch getrockneten ist.

Die Bestimmung der Porengrößen und der Porengrößenverteilung aus den Gasadsorptionsmessungen erfolgt nach dem standardisierten Auswerteverfahren von *Barrett, Joyner* und *Halenda* (BJH) [85] (vgl. Kapitel 3.4.2). Erfahrungsgemäß werden damit für Isothermen vom Typ IV (Abb. 3-9) die besten Ergebnisse erzielt.

**Tab. 4-5:** Charakterisierung der getrockneten Perlcellulose MT50 und MT100 mittels Helium-Pyknometrie und Quecksilberporosimetrie. Trocknung erfolgte durch Lösungsmittelaustausch (LMA). Die Messunsicherheit (nach GUM) der mittleren Porenweite  $D_{Hg}$  liegt bei 6 %.

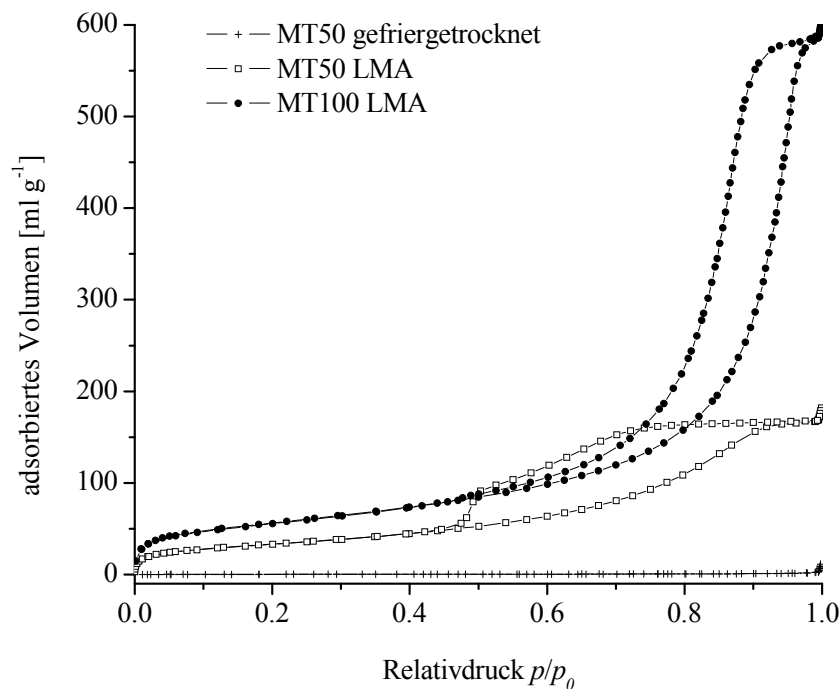
Probe	$\rho_{He}$ [g·cm <sup>-3</sup> ]	$P_{He}$ [%]	$D_{ZK}$ [μm]	$V_{P, sp}$ [ml g <sup>-1</sup> ]	$A_{Hg}$ [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	$D_{Hg}$ [nm]	$\varepsilon_{Hg}$ [%]
<b>MT50 LMA</b>	1.527	23	9.9	0.20	72.5	13.0	17
<b>MT100 LMA</b>	1.536	50	11	0.64	109.3	24.4	29

$\rho_{He}$	Reindichte (auch: Skelett-Dichte; mit Helium-Pyknometrie)
$P_{He}$	Porosität aus Helium-Pyknometrie ( $= V_{P, sp} / ((1 / \rho_{He}) + V_{P, sp}) * 100$ )
$D_{ZK}$	mittlerer Partikelabstand ( <i>void</i> )
$V_{P, sp}$	spezifisches Porenvolumen
$A_{Hg}$	spezifische Oberfläche
$D_{Hg}$	mittlere Porenweite (Quecksilberporosimetrie, nur Mesoporen)
$\varepsilon_{Hg}$	Porosität aus Hg-Porosimetrie

Die Porenvolumenverteilung wird durch die Differentiation  $dV/d\log(D)$  erhalten. Auffällig bei der Porenvolumenverteilung der MT50-Cellulose ist, dass bei der Stickstoffdesorption, im Gegensatz zur Stickstoffadsorption und der Hg-Porosimetrie, eine scheinbar bimodale Verteilung erhalten wird. Dies ist vermutlich auf das Phänomen des „Pore-Blocking“ zurückzuführen [86]. Dabei sind größere Poren nur über kleinere zugänglich (*Tintenfassporen*). Mit abnehmendem Desorptionsdruck beginnt ab einem bestimmten Relativdruck  $p/p_0$ , der für das jeweils eingesetzte Gas charakteristisch ist, das in den Poren befindliche flüssigkeitsähnliche Kapillarkondensat spontan zu siedeln. Für Stickstoff liegt dieser Wert bei einem Relativdruck von etwa 0.42. Dies hat zur Folge, dass alle blockierten Poren bei diesem Relativdruck spontan entleert werden, was zu der schmalen Porenverteilung bei etwa 3.2 nm führt, wodurch sich eine scheinbar bimodale Porenvolumenverteilung ergibt und die aus dem Desorptionszweig der Isotherme berechneten mittleren Porendurchmesser zu klein ausfallen. Zur Charakterisierung der Perlcellulose ist daher der Adsorptionszweig der Isotherme besser geeignet.

Für die Perlcellulose MT50 wurde die Trocknung mittels Lösungsmittelaustausch zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die erhaltenen getrockneten Proben jeweils mit der

Stickstoffsorption untersucht. Wie in Tab. 4-6 zu sehen ist, weichen die spezifischen Oberflächen um einen Wert von 8 % voneinander ab. Die Abweichung liegt im Bereich des doppelten Wertes der BET-Verfahrensunsicherheit (nach GUM<sup>-a-</sup>), die bei 4 % liegt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben ist somit nicht festzustellen. Die mittleren Porendurchmesser sind für beide Proben im Rahmen der Messgenauigkeit ebenfalls nahezu identisch. Somit kann man davon ausgehen, dass die Trocknungsmethode reproduzierbare Ergebnisse liefert.



**Abb. 4-4:** Stickstoff-Adsorptionsisothermen der Perlcellulosen MT50 und MT100; LMA: getrocknet mit Lösungsmittelaustausch.

Im Vergleich zur Stickstoffsorption liefert die Quecksilberporosimetrie höhere Werte für den mittleren Porendurchmesser der Perlcelluloseproben. Dies lässt sich damit erklären, dass die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode für Poren mit Durchmessern unterhalb von 10 nm abnimmt und Poren kleiner 3,6 nm Porenweite (dies entspricht einem Intrusionsdruck von 4000 bar) mit den handelsüblichen Geräten überhaupt nicht mehr detektiert werden können. Ein weiterer Grund könnte sein, dass es sich bei Cellulose um ein relativ weiches Material handelt. Bei hohen Drücken kann es daher möglicherweise zu einer Porenaufweitung kommen, was die gegenüber der Gasadsorption vergrößerten detektierten Porendurchmesser erklären würde.

<sup>-a-</sup> Abkürzung für den ISO/BIPM-Leitfaden „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“.



Vergleicht man nun die beiden Cellulose Typen MT50 und MT100, so ist zu erkennen, dass der mittlere Porendurchmesser für MT100 etwa doppelt so groß ist wie der von MT50. Dies gilt für beide Methoden. Bei der Quecksilberporosimetrie erhält man Werte von 13.0 nm bzw. 24.4 nm, d. h. der mittlere Porendurchmesser von MT100 ist 87 % größer. Bei der Stickstoffadsorption liegen die Werte bei 7.3 bzw. 15.9 nm, der mittlere Porendurchmesser von MT100 ist hier 118 % größer. Die Porengrößenverteilung ist bei MT100 insgesamt etwas breiter.

**Tab. 4-6:** Charakterisierung der getrockneten Perlcellulose MT50 und MT100 durch Gasadsorptions-Messungen (Stickstoffadsorption). Trocknung erfolgt durch Lösungsmittelaustausch (LMA). Die Messunsicherheiten der Methoden (nach GUM) liegen bei 4 % (BET-Oberfläche und mittlere Porenweite) bzw. 7 % (Porenweite am Peakmaximum).

Probe	$A_{BET}$ [m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	$D_{ads}$ [nm]	$D_{max,ads}$ [nm]	$D_{des}$ [nm]	$D_{max,des}$ [nm]
MT50 LMA 1	111.0	7.3	10.5	4.3	4.9
MT50 LMA 2	120.9	7.2	10.4	4.4	5.3
MT100 LMA	201.4	15.9	34.2	11.5	14.9

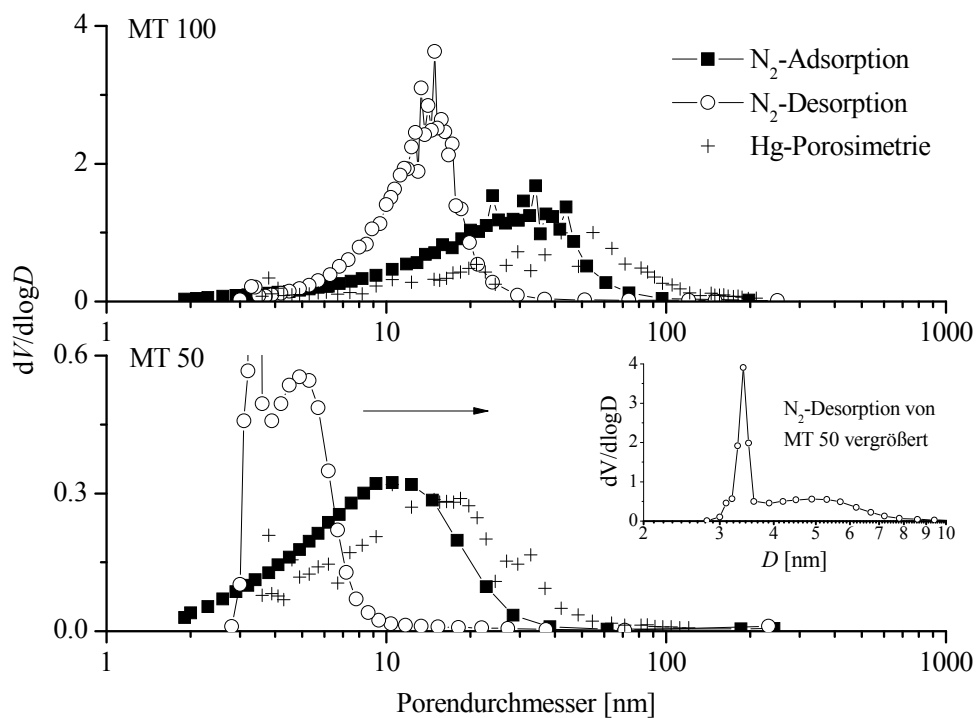
$A_{BET}$	BET-Oberfläche
$D_{ads}$	mittlere Porenweite (BJH Adsorption)
$D_{max,ads}$	Porenweite am Peakmaximum (BJH Adsorption)
$D_{des}$	mittlere Porenweite (BJH Desorption)
$D_{max,des}$	Porenweite am Peakmaximum (BJH Desorption)

Für die Perlcellulose MT50 wurden mit Hilfe der Stickstoffadsorption BET-Oberflächengrößen von 111 bzw. 121 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> bestimmt, für MT100 liegt die spezifische Oberfläche bei 201 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, wobei mit einer mittleren Methodenstandardunsicherheit von etwa 2 % unter Wiederholbedingungen zu rechnen ist. Die deutlich höheren Werte von MT100 lassen sich in erster Linie auf das größere Porenvolumen zurückführen. Diese Werte liegen über den mittels Hg-Porosimetrie bestimmten Werten von 73 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> für MT50 bzw. 109 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> für MT100.

Grundsätzlich sind mit beiden Methoden systematische Fehler zu erwarten. Mit der Hg-Porosimetrie werden kleine Poren unter 3.6 nm nicht mehr erfasst. Durch die hohen Drücke ist es zudem möglich, dass es zu einer Aufweitung der Poren kommt. Außerdem kann oftmals die Zwischenkornintrusion nicht eindeutig von der eigentlichen intrapartikulären Porenintrusion abgegrenzt werden, so dass die Hg-Porosimetrie häufig eher zu große Porenvolumina liefert. Die mittels der Hg-Porosimetrie gewonnenen spezifischen Oberflächen fallen dagegen oftmals zu klein aus, da die von der Methode nicht erfassten kleinen Poren die größten Beiträge zur

spezifischen Oberfläche liefern. Eine weitere Fehlerquelle bei empfindlichen Materialien ist eine mögliche Porenaufweitung.

Bei der Stickstoffsorption hingegen treten Probleme bei großen Poren mit Durchmessern oberhalb von etwa 100 nm auf, da diese nicht mehr als Poren aufgelöst werden können. Für die spezifische Oberfläche werden die Wandflächen dieser Poren jedoch mit erfasst, da die BET-Methode die Monoschichtbedeckung an allen inneren und äußeren Oberflächen der Probe auswertet, so dass die nach BET ermittelten spezifischen Oberflächenwerte generell als die genaueren anzusehen sind. Zudem soll nach Ergebnissen von *Rootare* [65] eine gute Übereinstimmung der mit beiden Methoden gewonnenen spezifischen Oberflächen nur bei Werten zwischen 10 und 100 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> vorliegen.

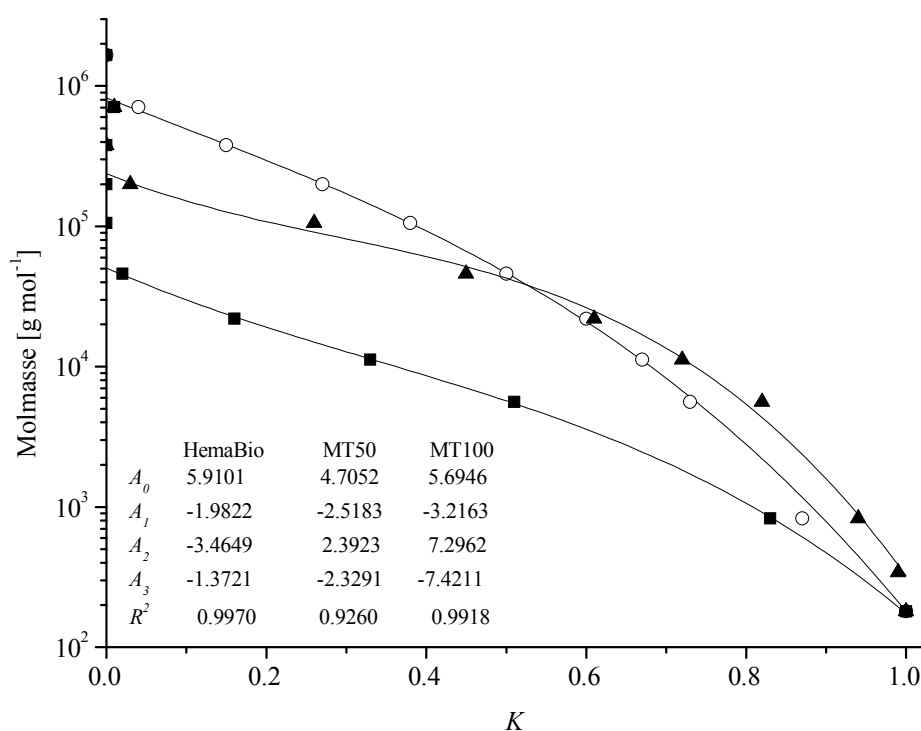


**Abb. 4-5:** Porengrößenverteilungen trockener Perlcellulosen MT50 und MT100 mit Hilfe von Stickstoffsorptionsmessungen und Quecksilberporosimetrie. Die kleine Abbildung zeigt eine Vergrößerung der N<sub>2</sub>-Desorptionskurve für die Probe MT50.

Für die gefriergetrockneten Produkte wurden BET-Werte erhalten, die um den Faktor 100 niedriger liegen. Dies zeigt, dass es bei der Trocknung zu einem nahezu vollständigen Kollabieren der Porenstruktur kommt. Daraus folgt, dass eine einfache Gefriertrocknung für die Probenpräparation der Perlcellulose-Proben ungeeignet ist.

#### 4.2.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Der Grossteil der Anwendungen von Perlcellulosen, sei es in ihrer nativen als auch in modifizierter Form, erfolgt in gequollener Form in wässrigen Medien. Eine Charakterisierung in diesem Zustand ist deshalb unbedingt nötig, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Porenstruktur auch bei schonender Trocknung vollständig erhalten werden kann. Die Methode der Wahl ist hier die wässrige Größenausschlusschromatographie (SEC). Die Primärinformation von SEC-Messungen ist das Elutionsvolumen. Um nun verschiedene Säulen mit variablen Durchmessern und Längen besser miteinander vergleichen zu können, wird daraus der Verteilungskoeffizient  $K$  ermittelt (vgl. Gl. 3-20). Das Zwischenkorn wird mit hochmolekularen Referenzmaterialien bestimmt, die nicht in die Porenstruktur der Säule eindringen. So wurde Pullulan mit einer Molmasse von  $1.66 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  verwendet. Die Bestimmung des Totalvolumens erfolgt mit niedermolekularen Substanzen. Diese sollten ähnliche chemische Eigenschaften wie die verwendeten Polymerstandards besitzen, so z. B. Glucose bei Polysaccharid-Standards oder  $\beta$ -Alanin bei Proteinen.

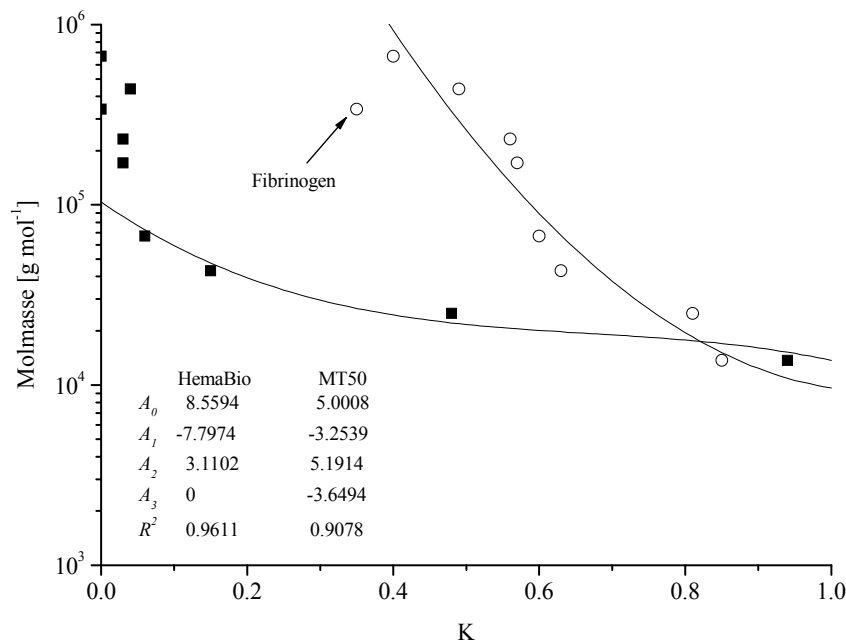


**Abb. 4-6:** Kalibrierkurven mit Molmasse gegen den Verteilungskoeffizienten für Pullulane auf Hema-Bio 1000 Å + Guard (○), MT50 (■), MT100 (▲); Kurvenanpassung:  $\lg M = A_0 + A_1 V_e + A_2 V_e^2 + A_3 V_e^3$

Für die beiden Perlcellulose-Typen wurden jeweils Glassäulen mit einem Innendurchmesser von 10 mm und einer max. Bettlänge von 250 mm verwendet, diese sind Druckstabil bis 80 bar. Durch einen höhenverstellbaren PTFE-Stempel lassen sie sich flexibel füllen. Die Säulen wurden in der Regel bis zu einer Höhe von ca. 20 cm gepackt. Das Säulenvolumen war

mit  $15.7 \text{ cm}^3$  somit vergleichbar mit kommerziellen analytischen SEC-Säulen, die in der Regel Innendurchmesser von 8 mm und eine Bettlänge von 30 cm besitzen (d.h.  $V_{\text{Gelbett}} = 15.1 \text{ cm}^3$ ). Als Referenzsäule wurde hier eine HEMA-Bio 1000 Å Säule von PSS ausgewählt. Diese Säulen auf Basis von Hydroxyethylmethacrylat-Copolymeren wurden speziell für die Anforderungen von Biopolymeren entwickelt und sollen in späteren Versuchen zur Charakterisierung von Insulinlösungen verwendet werden.

Als Eluent für die Untersuchungen wurde ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6.5 und einer Konzentration von  $0.01 \text{ mol l}^{-1}$  verwendet. Zusätzlich wurden  $0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaNO}_3$  zugesetzt. Der hohe Salzgehalt ist nötig, um Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Analyt zu minimieren, was insbesondere bei der Proteinanalytik wichtig ist. Zudem wird die Viskosität der injizierten Polymerlösungen im Vergleich zu rein wässrigen Lösungen reduziert. Dies ist besonders für hochmolekulare knäueiförmige Polymere wichtig. Eine zu hohe Viskosität der Polymerlösung kann u. a. zu Problemen bei der Probeninjektion führen und im ungünstigsten Fall einen Scherabbau der Polymere bewirken.



**Abb. 4-7:** Kalibrierkurven mit Molmasse gegen den Verteilungskoeffizienten für Proteine auf Hema-Bio 1000 Å + Guard (○) und MT50 (■). Fibrinogen wurde zur Anpassungen der Kurven nicht verwendet. Kurvenanpassung:  $\lg M = A_0 + A_1 V_e + A_2 V_e^2 + A_3 V_e^3$

Standardbedingungen bei allen Messungen sind Flussgeschwindigkeiten von  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , ein Injektionsvolumen von  $100 \mu\text{l}$  und eine Probenkonzentration von ca.  $2 \text{ g l}^{-1}$ . Nur im Falle des hochmolekularen Pullulans mit  $1.66 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  wurde die Konzentration auf  $1 \text{ g l}^{-1}$  verringert, um eine zu hohe Viskosität der Injektionslösung zu verhindern. Für jede Substanz wurden aus der Elutionskurve das Elutionsvolumen  $V_e$  am Peakmaximum und daraus der

Verteilungskoeffizient  $K$  bestimmt. Durch Auftragen der Molmasse über  $K$  wurden die Kalibrationskurven erhalten. Diese wurden mit Hilfe eines Polynoms dritten Grades gepasst. Die Ergebnisse – d.h. Messwerte und Kurvenanpassungen – sind in Abb. 4-6 und Abb. 4-7 dargestellt. Die Pullulan Kalibrierkurven zeigen einen typischen S-förmigen Verlauf. Je flacher die Steigung der Kurve desto besser ist die Trenneffizienz der Säule. An den Rändern - d.h. bei großen und kleinen Molmassen - hingegen nimmt die Steigung zu, die Trennung der Polymere verschlechtert sich. So wird bei der MT50 Säule mit Pullulanen  $> 100\,000\text{ g mol}^{-1}$  ein nahezu senkrechter Kurvenverlauf erhalten. In diesem Molmassenbereich kommt es zu keiner Trennung mehr, alle Polymere eluieren beim gleichen Volumen.

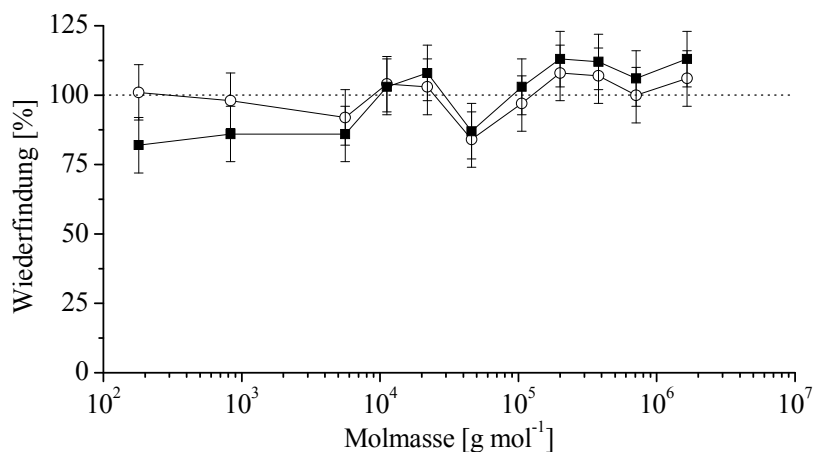
Der Trennbereich der einzelnen Säulen ist sehr unterschiedlich: Die HEMA-Bio Säule trennt über einen Bereich von nahezu vier Größenordnungen, die MT50 Säule hingegen liefert nur für Pullulane kleiner  $40\,000\text{ g mol}^{-1}$  gute Trennergebnisse. In diesem Bereich ist die Trennung jedoch effizienter als bei der HEMA-Bio Säule, was an der geringeren Steigung der Kalibrierkurve zu erkennen ist. Bei der MT100 Säule liegt die obere Grenze im Bereich von  $200\,000\text{ g mol}^{-1}$ .

Die Messwerte der Protein-Kalibrierkurve mit der Hema-Bio Säule zeigen eine deutlich stärkere Streuung als bei den Pullulan-Kurven. Besonders Fibrinogen weicht stark von der Anpassungsfunktion ab, es eluiert bei deutlich kleineren Volumina als für seine Molmasse zu erwarten wäre. Der Grund liegt bei der Stäbchenform des Fibrinogens, während es sich bei allen anderen untersuchten Proteinen um globuläre Proteine handelt. So besitzt Fibrinogen einen Stokes-Radius  $R_S$  von  $10.7\text{ nm}$  und eine Grenzviskosität  $[\eta]$  von  $20.4\text{ ml g}^{-1}$ , bei Thyroglobulin hingegen, mit einer nahezu doppelt so hohen Molmasse, liegt  $R_S$  bei  $8.5\text{ nm}$  und  $[\eta]$  bei nur  $4.7$ . Da in der SEC eine Trennung nach dem hydrodynamischen Volumen und nicht nach der Molmasse erfolgt, eluiert Fibrinogen somit früher. Für die Erstellung der Standard-Kalibrierkurve ist es hier nicht geeignet. Diese sollte nur mit (Bio-)Polymeren ähnlicher Struktur - z. B. ausschließlich globuläre Proteine – erfolgen.

Eine allgemein gültigere Kalibrierkurve könnte durch die Auftragung der hydrodynamischen Radien über dem Verteilungskoeffizienten erhalten werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine sog. universelle Kalibrierung nach *Benoit* [55]. In diesem Fall wird das Produkt von Molmasse  $M$  und Grenzviskosität  $[\eta]$  über dem Verteilungskoeffizienten aufgetragen. Dieses Produkt ist entsprechend der *Flory-Fox*-Gleichung [54] direkt proportional dem hydrodynamischen Volumen. Für globuläre Proteine ergeben sich hier allerdings Probleme: Auf Grund ihrer Kugelform und der daraus folgenden niedrigen Grenzviskosität ist deren Bestimmung mit einer

relativ großen Ungenauigkeit verbunden <sup>-a-</sup>. Zudem ist anzumerken, dass vor allem für Proteine der Wert der Flory-Konstanten  $\Phi$  häufig stark variiert und genau genommen für eine universelle Kalibrierung das Produkt  $[\eta] \cdot M / \Phi$  gegen  $K$  aufgetragen werden müsste [57].

Die Bestimmung der Wiederfindungen erfolgte durch die Integration der RI-Signale. Da Pullulane mit HEMA-Bio Säulen unter den gegebenen Bedingungen erfahrungsgemäß keine Wechselwirkungen zeigen, wurde eine (mittlere) 100 %ige Wiederfindung angenommen. Bestimmt man die Wiederfindungen der Polysaccharid-Standards für die MT50 Säule so zeigt sich, dass die kommerzielle Hema-Bio Säule etwas geringere Schwankungen aufweist. Dies ist jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit akzeptabel und ist vermutlich auf eine bessere Säulenpacktechnik des kommerziellen Produkts zurückzuführen: Durch eine Verbreiterung der Peaks bei der selbstgepackten Säule, werden niedermolekulare Anteile im Bereich des Totalvolumens nicht mehr komplett erfasst, so dass die Pullulanproben mit Molmassen kleiner  $10\,000\text{ g mol}^{-1}$  etwas geringere Wiederfindungen aufweisen.



**Abb. 4-8:** Wiederfindung der Pullulan-Standards auf einer MT50-Säule (■) sowie auf einer kommerziell erhältlichen HEMA-Bio Säule (○). (Eluent: 0.2 M  $\text{NaNO}_3$  + 10 mM Phosphatpuffer pH 6.5). Der geschätzte Fehler liegt bei  $\pm 10\%$ .

Der nahezu parallele Kurvenverlauf ist dadurch zu erklären, dass bei beiden Messreihen dieselben Standardlösungen eingesetzt worden sind. Fehler, die durch die Einwaage entstehen – z.B. auf Grund eines bestimmten Gehalts an Restwasser in der Pullulanprobe – treten deshalb bei beiden Reihen identisch auf. Der Mittelwert der Wiederfindung bei der MT50-Säule liegt bei annähernd 100 %. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Polysaccharidstandards mit dem Gelmaterial keine signifikanten Wechselwirkungen eingehen.

<sup>-a-</sup> Thyroglobulin mit einer Molmasse von  $667\,000\text{ g mol}^{-1}$  besitzt z. B. eine Grenzviskosität  $[\eta]$  von  $5\text{ ml g}^{-1}$ , Pullulan mit  $710\,000\text{ g mol}^{-1}$  hingegen einen Wert von  $199\text{ ml g}^{-1}$ .

#### 4.2.6 Inverse Größenausschlusschromatographie (ISEC)

Für die Porenanalyse der Perlc ellulose mittels ISEC können direkt die Daten der SEC-Untersuchungen (vgl. Kap. 4.2.5) verwendet werden. Für die mit dem zu untersuchenden Material gefüllten Chromatographiesäulen werden jeweils die Elutionsvolumina der Polymerstandards (hier: Pullulan) in Abhängigkeit von den Molmassen  $M_p$  bestimmt (vgl. Abb. 4-6). Die Auswertung erfolgte in erster Linie mit Hilfe der PoroCheck-Software von Polymer Standard Service (PSS; Mainz) [70]. Als Porenmodell kann sowohl ein Zylinder- als auch einem Spaltporenmodell verwendet werden. Zusätzlich muss entschieden werden, ob eine monomodale Porengrößenverteilung vorausgesetzt werden soll oder ob das Programm selbstständig zwischen einer mono- oder bimodalen Verteilung wählen kann.

Entscheidend für die Auswertung ist der Zusammenhang zwischen der Molmasse und dem Radius der verwendeten Polymere. Durch Auftragung der gemessenen Pullulanradien  $r$  (siehe Tab. 4-2) über die gewichtsmittleren Molmassen  $M_w$  können mit Hilfe einer potenziellen Regressionskurve die Parameter  $K$  und  $\alpha$  der empirischen Gleichung

$$\text{Gl. 4-2} \quad r = K \cdot M_w^\alpha$$

bestimmt werden (Tab. 4-7). Betrachtet man nur die Pullulane mit Molmassen von 22 000 g mol<sup>-1</sup> und kleiner, so werden für  $r_S$  die größten Radien bestimmt (da  $K$  groß,  $\alpha$  klein), für größere  $M_w$  ist  $r_g$  jeweils am größten ( $K$  klein,  $\alpha$  groß). Die berechneten Parameter stimmen gut mit Werten aus der Literatur überein.

**Tab. 4-7:** Parameter der  $r$ - $M$ -Beziehung von Pullulan für Viskositätsradien  $r_\eta$ , Stokesradien  $r_S$  (aus DLS-Messungen) und den Trägheitsradien  $r_g$  (aus MALLS Untersuchungen) im Vergleich zu entsprechenden Literaturwerten. Parameter basieren auf den Meßwerten von Tab. 4-2.

	$K$	$a$	$R^2$	$K_{Lit}$	$a_{Lit}$	Lit.
$r_\eta$	0.0153	0.5570	0.9995	0.0146	0.554	[87]
$r_S$	0.0274	0.5151	0.9989	0.0243	0.5123	[87]
$r_g$	0.0110	0.5978	0.9902	0.0147	0.58	[88]

Für die drei unterschiedlichen  $M$ - $r$ -Beziehungen wird anschließend eine Analyse durchgeführt, um zu untersuchen welchen Einfluss diese auf die Ergebnisse der Porenanalyse haben. Aus dem Zusammenhang von Verteilungskoeffizient und Polymerradius (bezogen auf die Molmasse am Peakmaximum  $M_p$ ) konnten mit der PoroCheck-Software die oberflächen- und volumenbezogenen Porengrößen ( $R_S$  bzw.  $R_V$ ),  $\sigma$  als Maß für die Breite der Verteilung sowie die auf das Porenvolumen bezogenen Oberfläche  $O_{Pore} / V_{pore}$  bestimmt werden. Eine Übersicht

über die Ergebnisse unter der Annahme einer monomodalen Verteilung ist in Tab. 4-8 angegeben. Hier fällt vor allem auf, dass die oberflächengemittelte Porengröße zunächst von der jeweiligen  $M$ - $r$ -Beziehung abhängt. So werden jeweils bei Verwendung der Stokes-Radien die höchsten Werte bestimmt, da diese für kleine Pullulanstandards am höchsten sind. Die Werte der volumengemittelten Porengrößen hängen zusätzlich davon ab, wie groß der Wert  $\sigma$ , d.h. wie breit die Verteilung ist. Je nach verwendetem Radius schwankt  $\sigma$  teils erheblich. So werden jeweils unabhängig vom Porenmodell oder der Probe für  $r_g$  die breitesten Verteilungen und für  $r_s$  die engsten Verteilungen erhalten.

**Tab. 4-8:** Ergebnisse der ISEC von MT50 und MT100 für ein Zylinder- und Spaltmodell und verschiedene  $r$ - $M$ -Beziehungen der Pullulan Standards ( $r_\eta$  berechnet aus Viskositätsdaten nach Gl. 4-1;  $r_s$  aus DLS-Daten (5.6 – 1540 kD);  $r_g$  aus MALLS-Messungen (106 – 1540 kD)). Die entsprechenden  $K$  und  $\alpha$ -Werte sind in Tab. 4-7 angegeben. Auswertung erfolgte mit Hilfe der PoroCheck Software (PSS, Mainz) unter Annahme einer monomodalen Verteilung.

	MT50			MT100		
	$r_\eta$	$r_s$	$r_g$	$r_\eta$	$r_s$	$r_g$
<b>Zylindermmodell</b>						
$R_s$ [nm]	<b>6.36</b> $\pm 0.39$	8.44 $\pm 0.30$	6.09 $\pm 0.54$	<b>20.85</b> $\pm 1.24$	23.62 $\pm 0.66$	21.93 $\pm 1.72$
$R_V$ [nm]	<b>7.2</b> $\pm 0.3$	8.5 $\pm 0.2$	7.8 $\pm 0.5$	<b>21.5</b> $\pm 1.1$	23.6 $\pm 0.7$	25.3 $\pm 1.8$
$\sigma$ [nm]	<b>2.3</b> $\pm 0.8$	0.8 $\pm 1.1$	3.2 $\pm 0.7$	<b>3.5</b> $\pm 3.5$	0.0 $\pm 3.3$	8.6 $\pm 5.2$
$O_{Pore}/V_{Pore}$ [m <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> ]	<b>314.6</b> $\pm 20.1$	236.9 $\pm 8.6$	328.4 $\pm 31.7$	<b>95.9</b> $\pm 6.0$	84.7 $\pm 2.4$	86.8 $\pm 6.7$
<b>Spaltmodell</b>						
$R_s$ [nm]	6.85 $\pm 0.57$	9.36 $\pm 0.49$	6.46 $\pm 0.73$	22.36 $\pm 1.59$	26.85 $\pm 1.35$	23.53 $\pm 2.07$
$R_V$ [nm]	8.8 $\pm 0.5$	10.4 $\pm 0.4$	9.6 $\pm 0.7$	26.5 $\pm 1.7$	28.2 $\pm 2.6$	31.0 $\pm 2.6$
$\sigma$ [nm]	3.7 $\pm 0.7$	3.1 $\pm 1.0$	4.5 $\pm 0.7$	9.6 $\pm 2.8$	6.0 $\pm 6.0$	13.3 $\pm 2.9$
$O_{Pore}/V_{Pore}$ [m <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> ]	291.9 $\pm 26.4$	213.7 $\pm 11.8$	309.6 $\pm 31.4$	89.5 $\pm 6.8$	74.5 $\pm 3.9$	85.0 $\pm 8.3$

Wird nicht vorher eine monomodale Verteilung festgelegt, so berechnet das Programm unter bestimmten Bedingungen bimodale Porengrößenverteilungen. Für MT50 ist dies bei Verwendung von  $r_\eta$  und Spaltporen sowie bei  $r_g$  mit Zylinder- und Spaltporen der Fall. In allen drei Fällen werden jeweils sehr enge Peaks erhalten, wobei die kleinen Poren im Schnitt 2 nm und die großen 10 nm groß sind. Für MT100 wird nur mit  $r_g$  und dem Spaltmodell eine



bimodale Verteilung errechnet. Hier wird ein breitverteilter Peak mit 6 nm und ein engverteilter Peak mit 34 nm erhalten. Der Volumenanteil der großen Poren liegt in allen Fällen sowohl für MT50 als auch MT100 im Bereich von 80 %.

Nun stellt sich die Frage, welche  $r$ - $M$ -Beziehung und welches Porenmodell die beste Wahl darstellt. Trägheitsradien und Stokes-Radien können einerseits mit MALLS bzw. DLS direkt bestimmt werden. Dies ist jedoch erst ab einer bestimmten Partikelgröße mit einer akzeptablen Genauigkeit möglich (MALLS:  $D \sim \lambda/20$ , DLS:  $D \sim 2\text{-}3\text{ nm}$ ). Hingegen können Grenzviskositäten noch für deutlich kleinere Molmassen mit einem akzeptablen Fehler bestimmt werden. Die Genauigkeit nimmt auch hier mit abnehmender Molekülgröße ab, der Wert von  $[\eta]$  geht jedoch nur mit einem Exponenten von  $1/3$  in die Berechnung von  $r_\eta$  ein. Anzumerken ist allerdings, dass Gl. 4-1 laut Definition nur für ausreichend hochmolekulare ungestörte Knäuel gültig ist. Mit abnehmender Molmasse weicht die tatsächliche Form linearer Polymere in Lösung von einer idealen Knäuelstruktur deutlich ab. Nach *Gorbunov* [71] sind alle drei Typen prinzipiell für die ISEC geeignet, jedoch wird angenommen, dass es sich beim Viskositätsradius um den effektiven Radius der SEC handelt, da in ihm sowohl Informationen hinsichtlich der Molmassen als auch der Molekülform (in Form der Viskosität) implementiert sind [83] [89]. Somit scheint  $r_\eta$  die am besten geeignete Größe für die ISEC zu sein.

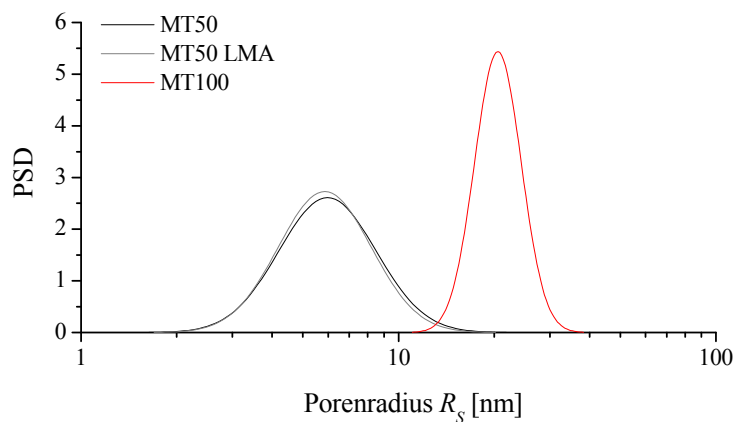
Auch wenn die tatsächliche Porenform poröser Cellulosepartikel deutlich von den vereinfachten Modellen der Zylinder- oder Spaltporen abweicht, so hat sich gezeigt dass die Wahl des Porenmodells in der ISEC einen relativ geringen Einfluss besitzt [90]. Vor allem das Zylindermodell kann als nahezu universelles Modell für eine Vielzahl von unterschiedlichen Materialien zur Porencharakterisierung eingesetzt werden [83]. Auswertungen von *Hagel et al.* zeigten nur geringe Unterschiede zwischen dem Zylinder- und Spaltmodell [91].

Vergleicht man die Ergebnisse für die beiden Porenmodelle, so wird beim Spaltmodell jeweils eine um ca. 9 % größere oberflächenbezogene Porengröße  $R_s$  bestimmt. Bei der volumenbezogenen Porengrößen  $R_V$  sind die Unterschiede jeweils im Durchschnitt 22 % höher. Dies liegt vor allem daran, dass jeweils breitere Verteilungskurven für  $R_V$  ermittelt werden. Analog dazu werden für das Verhältnis  $O_{Pore} / V_{Pore}$  mit dem Spaltmodell jeweils um ca. 8 % kleinere Werte erhalten.

Neben einer Auswertung mit Hilfe der PoroCheck-Software wurde eine vereinfachte Methode nach *Casassa* [92] angewandt. Als Modell werden hierfür Zylinderporen und kugelförmige Sondenmoleküle angenommen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch Pullulane – somit knäueiförmige Polymere – mit ausreichender Genauigkeit für das Modell eingesetzt werden können [87]. Für den Verteilungskoeffizient der SEC  $K$  gilt

**Gl. 4-3** 
$$K = (1 - r/R)^2,$$

wobei  $r$  dem Radius der Polymere und  $R$  dem Porenradius entspricht. Trägt man die Radien der Sondenmoleküle gegen die Werte von  $(1 - K^{0.5})$  auf, so erhält man für den Bereich  $r < R$  eine Gerade, deren Steigung dem Wert von  $R$  entspricht. Werden die Viskositätsradien  $r_\eta$  verwendet, so erhält man für MT50  $(6.03 \pm 0.13)$  nm und für MT100  $(18.72 \pm 0.42)$  nm. Wird der Stokes-Radius  $r_s$  eingesetzt, erhält man  $(7.23 \pm 0.09)$  nm bzw.  $(20.77 \pm 0.18)$  nm. Diese Werte stimmen gut mit den  $R_s$ -Werten der PoroCheck-Auswertung überein. Allerdings können mit dieser Methode keine Größenverteilungen der Poren erfasst werden, sondern nur Mittelwerte.



**Abb. 4-9:** Oberflächenbezogene Porenverteilung der Porenradien durch ISEC; Sondenmoleküle: Pullulan  $180 - 1.54 \cdot 10^6$  g mol<sup>-1</sup> ( $r$ - $M$ -Beziehung basierend auf  $r_\eta$ ); Auswertung mittels PoroCheck Software von PSS; Modell: Zylinderporen mit monomodaler Porengrößenverteilung

Für die weitere Diskussion sollen nur die Ergebnisse basierend auf Viskositätsradien bei Annahme eines Zylindermodells und einer monomodalen Porengrößenverteilung verwendet werden. Diese Daten stimmen zunächst gut mit den Ergebnissen der Stickstoffadsorption überein. Für MT50 wird mittels ISEC ein mittlerer Porendurchmesser von 12.7 nm erhalten, für MT100 ein Wert von 41.7 nm. Diese Werte liegen etwas über denen, die für die getrocknete Perlcellulose mittels Gasadsorption bestimmt wurden. Das Peakmaximum von MT50 liegt somit um 21 % über dem mittels N<sub>2</sub>-Adsorption bestimmten Wert, bei MT100 liegt der Wert um 22 % darüber. Vergleicht man die Verteilungskurven der ISEC (Abb. 4-9) mit den N<sub>2</sub>-Adsorptionskurven (Abb. 4-5), so findet sich vor allem für MT50 eine sehr gute Übereinstimmung: Die Porendurchmesser befinden sich bei der ISEC im Bereich zwischen 4 und 40 nm, bei der N<sub>2</sub>-Adsorption zwischen 2 und 40 nm. Allerdings fällt auf, dass der mittlere Porendurchmesser der N<sub>2</sub>-Adsorption mit 7.3 nm deutlich kleiner als bei der ISEC ausfällt. Dies ist vermutlich in erster Linie auf die Form der Verteilungskurve zurückzuführen: Während

für die N<sub>2</sub>-Adsorption eine asymmetrische Verteilung mit Schwerpunkt auf den kleinen Poren erhalten wird, erfolgt die Kurvenanpassung in der ISEC nur mit Hilfe einer symmetrischen Funktion (PSD vs.  $\log R$ ). Bei MT100 ist dies noch deutlicher zu erkennen, die Verteilung der N<sub>2</sub>-Adsorption ist hier noch stärker asymmetrisch. Somit liegen auch die mittleren Porengrößen mit 15.9 nm deutlich unter dem Wert der ISEC mit 41.7 nm. Zusätzlich ist zu beachten, dass bei der inversen SEC als kleinstes Sondenmolekül Glucose mit einer Molmasse von 180 g mol<sup>-1</sup> eingesetzt wurde. Da dieses deutlich größer als elementarer Stickstoff ist, ist davon auszugehen, dass sehr kleine Poren schlechter detektiert werden können.

Andererseits könnten die Unterschiede zumindest teilweise auch auf den Trocknungsprozess zurückzuführen sein. Dies würde bedeuten, dass es auch bei der Trocknung mittels Lösungsmittelaustausch zu einer Schrumpfung der Poren kommt. Darauf deutet auch hin, dass beim Trocknen der Partikel deren mittlerer Partikeldurchmesser  $D$  deutlich abnimmt (MT50: 34 → 26 µm; MT100: 43 → 29 µm; vgl. Tab. 4-4). Insgesamt sind die Abweichungen jedoch erstaunlich gering, wenn man bedenkt wie unterschiedlich die eingesetzten Methoden und die Vorbehandlung der Proben sind.

Neben den gequollenen Perlcellulosen wurde zusätzlich eine mittels Lösungsmittelaustausch getrocknete Cellulose MT50 LMA untersucht. Diese wurde über Nacht in Wasser gequollen und anschließend genauso wie die ungetrockneten Proben untersucht. Es wurden Werte für  $R_s = 6.20$  nm bzw.  $R_V = 6.9$  nm bestimmt. Insgesamt konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen MT50 und MT50 LMA festgestellt werden. So kann gezeigt werden, dass der Trocknungsvorgang keinerlei Auswirkungen auf die Porenstruktur hat. Sollte bei der Trocknung eine Schrumpfung der Poren auftreten, so ist diese demnach reversibel.

Neben den Porengrößen und deren Verteilung kann mit der ISEC zusätzlich noch die Oberfläche pro Porenvolumen  $S_{Pore}/V_{Pore}$  bestimmt werden. Unter Verwendung des Bettvolumens  $V_B$  (MT50: 3.8 ml g<sup>-1</sup>; MT100: 9.5 ml g<sup>-1</sup>; jeweils Herstellerangaben), dem Säulenvolumen  $V_{Säule}$  sowie dem Porenvolumen  $V_i$  (d.h.  $V_{ges} - V_0$ ; vgl. 3.3.1) kann dieser Wert anschließend in die spezifische Oberfläche  $S_{sp}$  (Einheit: m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) umgerechnet werden:

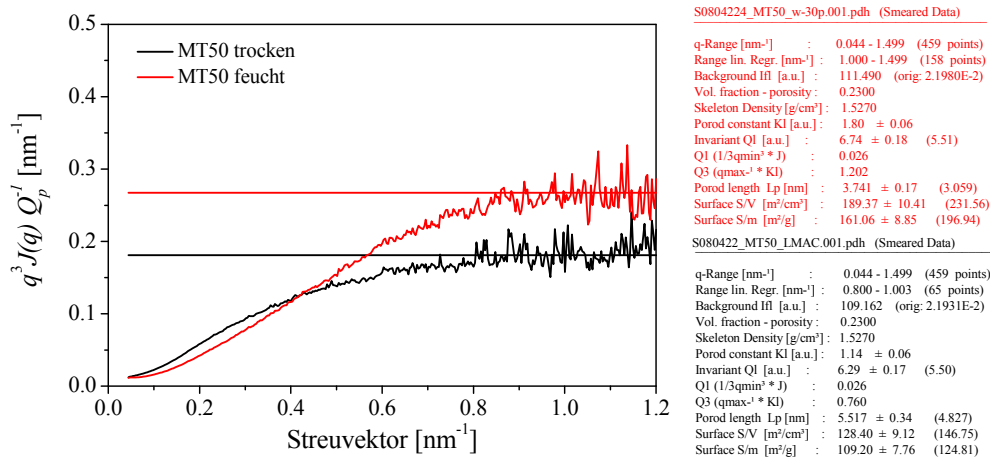
**Gl. 4-4**

$$S_{sp} = S/V_{Pore} \cdot V_B \cdot \frac{V_i}{V_{Säule}}$$

Für MT50 wird so eine spezifische Oberfläche von 355 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> und für MT100 ein Wert von 367 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> erhalten. Dies bedeutet, dass die chromatographisch zugänglichen Oberflächen für beide Cellulose-Typen bezogen auf die Masse nahezu identisch sind.

#### 4.2.7 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

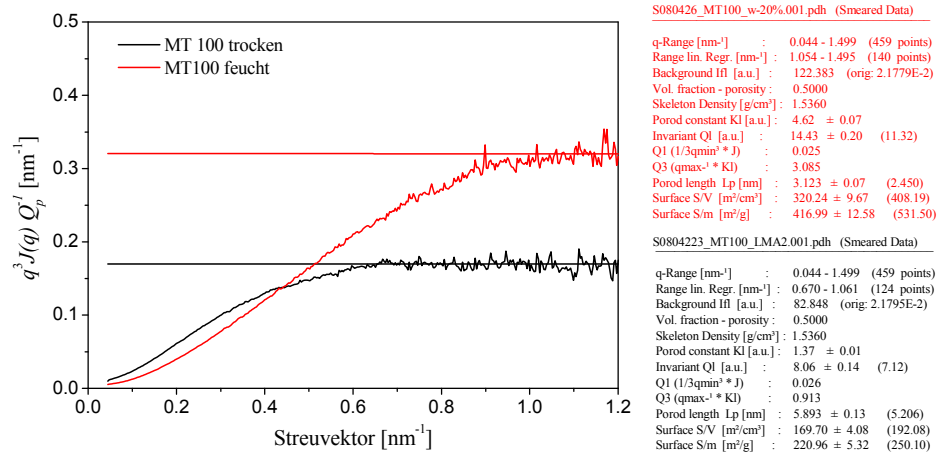
Das Trocknen poröser Partikel kann deren spezifische Oberfläche und Porenstruktur bisweilen stark verändern. Deshalb ist es von großem Interesse, diese Parameter direkt und ohne einen zusätzlichen Trocknungsprozess zu bestimmen. Dies ist – wie auch bei der ISEC – mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) möglich. Im Gegensatz zur ISEC können jedoch zusätzlich auch getrocknete Partikel untersucht werden. Des Weiteren wird mit SAXS die komplette Porenstruktur erfasst und nicht nur diejenigen Poren, die den Sondenmolekülen zugänglich sind.



**Abb. 4-10:** Normalisierte Porod-Plots der SAXS Daten von MT50 im gequollenen Zustand (rote Kurve) und in getrocknetem Zustand (schwarz). Die durchgehenden, horizontalen Linien sind die Porod-Asymptoten mit den Werten von  $l_p^{-1}$ .

In Abb. 4-10 sind die Streukurven der MT50 Perlcellulose in feuchtem und trockenem Zustand in der Porod-Form als  $q^3 J(q) Q_p^{-1}$  aufgetragen (rote bzw. schwarze Linien). Durch Multiplikation der üblichen  $q^3 J(q)$ -Darstellung mit  $Q^{-1}$  wurden die Kurven normalisiert, so dass ein direkter Vergleich der Asymptoten möglich ist (die Geraden in Abb. 4-10). Diese sind identisch mit dem reziproken Wert von  $l_p$ . Für diese Normalisierung wurden die jeweils unterschiedlichen Streukontraste (d.h. Elektronendichten) für luft- bzw. wassergefüllte Poren berücksichtigt.

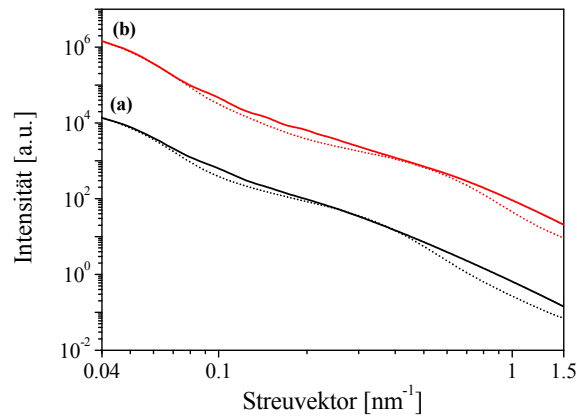
Es kann gezeigt werden, dass der  $l_p$ -Wert von MT50 in feuchtem Zustand mit  $(3.74 \pm 0.17)$  nm niedriger liegt als im trockenen Zustand bei  $(5.52 \pm 0.34)$  nm. Demzufolge ist die spezifische Oberfläche der feuchten Partikel mit  $(161 \pm 9)$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> größer als für die trockene Probe MT50 mit  $(109 \pm 8)$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Wie Abb. 4-11 zeigt, kann derselbe Trend auch für MT100 beobachtet werden. Die  $l_p$ -Werte für MT100 in feuchtem und trockenem Zustand sind  $(3.12 \pm 0.07)$  nm und  $(5.89 \pm 0.13)$  nm. Die spezifischen Oberflächen für MT100 sind  $(417 \pm 12)$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> in feuchtem und  $(221 \pm 5)$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> in trockenem Zustand.



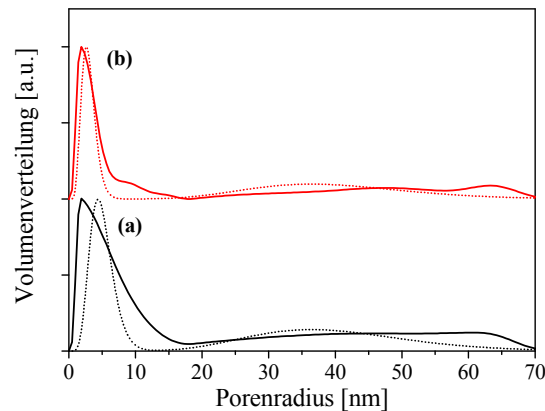
**Abb. 4-11:** Normalisierte Porod-Plots der SAXS Daten von MT100 im gequollenem Zustand (rote Kurve) und in getrockneten Zustand (schwarz). Die durchgehenden, horizontalen Linien sind die Porod-Asymptoten mit den Werten von  $l_p^{-1}$ .

Vergleicht man die Werte der spezifischen Oberfläche, die mittels BET und mit SAXS bestimmt worden sind, so erkennt man, dass die Ergebnisse für MT50 und MT100 im trockenen Zustand gut übereinstimmen. Die feuchten Proben können nicht mit Hilfe der BET-Methode untersucht werden. Hier ist SAXS eindeutig überlegen, es können sowohl trockene als auch feuchte Proben auf dieselbe Art und Weise untersucht werden. Dies ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da gezeigt werden kann, dass trotz einer schonenden Trocknungsmethode wie dem Lösungsmittelaustausch die hohe spezifische Oberfläche des Cellulosematerials nicht komplett erhalten werden kann. Offensichtlich verringert der Trocknungsprozess die spezifische Oberfläche sowohl von MT50 als auch von MT100 signifikant. Dies wurde so nicht erwartet und lässt darauf schließen, dass bei der BET-Methode signifikant und systematisch die spezifische Oberfläche zu klein bestimmt wird. Mit Hilfe der Form der SAXS-Kurven können Informationen hinsichtlich der Porenstruktur erhalten werden. Die Abwesenheit von Reflexionspeaks zeigt, dass die Poren näherungsweise statistisch verteilt sind, zumindest im Bereich der Porengrößen, die mit unserem SAXS-Experiment erfasst werden (d.h. < 80 nm). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erwartungen, wenn man den Herstellungsprozess der Perlcellulose betrachtet.

Als nächster Arbeitsschritt wurden die SAXS Kurven mit Hilfe der Methode der Indirekten Transformation (IFT) nach Glattnner „entschmiert“, so dass eine Bestimmung der Porengrößenverteilung erfolgen kann [93]. Zur Vereinfachung wird eine Kugelform der Poren angenommen. Die Ergebnisse sind als durchgehende Kurven in Abb. 4-12 (Kollimatorsystem korrigierte SAXS-Kurven) und in Abb. 4-13 (volumengemittelte Porengrößenverteilung) für MT50 dargestellt.



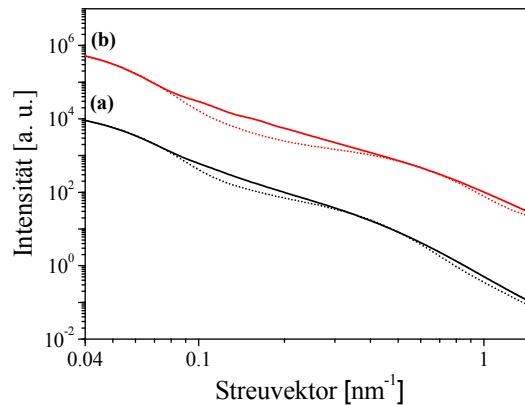
**Abb. 4-12:** SAXS Kurven von MT50 in trockenem und feuchtem Zustand (Linien (a) bzw. (b)), korrigiert für ein Schlitz-Längen-Profil mit Hilfe der IFT Methode. Die gepunkteten Linien sind Anpassungskurven für eine bimodale Porengrößenverteilung. Die Kurve (b) wurde zur besseren Darstellbarkeit mit einem Faktor von  $10^2$  multipliziert.



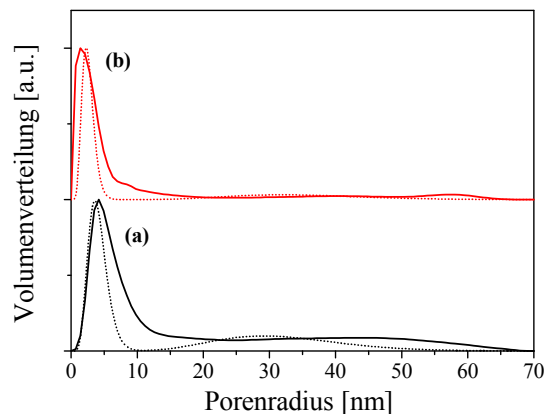
**Abb. 4-13:** Volumengewichtete Porengrößenverteilung von MT50 im trockenem und feuchten Zustand (Kurven (a) bzw. (b)). Die durchgehenden Linien wurden mit Hilfe der IFT-Methode bestimmt und stimmen mit den durchgehenden SAXS-Kurven in Abb. 4-12 überein. Die gepunkteten Linien entsprechen den gepunkteten Anpassungskurven in Abb. 4-12. Die Kurve (b) wurde wegen der besseren Darstellbarkeit vertikal verschoben.

Zum Vergleich wurde dieselbe IFT-Prozedur auch für die MT100-Partikel durchgeführt. Die SAXS-Kurven sowie die Porengrößenverteilung sind in Abb. 4-14 und Abb. 4-15 dargestellt. Man erkennt, dass beide, MT50 und MT100, sowohl in trockenem als auch in feuchtem Zustand eine bimodale Porengrößenverteilung besitzen. Die kleineren Poren haben Größen im Bereich von 1 bis 15 nm mit Maxima kleiner 5 nm. Die größeren Poren liegen zwischen 15 und 70 nm. Es ist deutlich zu sehen dass die kleinen Poren von MT50 in trockenem Zustand (4 bis 5 nm) deutlich größer sind als in feuchtem (2 bis 3 nm). Dasselbe gilt für MT100, auch hier sind die Poren in trockenem Zustand mit 4 bis 5 nm größer als im feuchten Zustand mit 1.5 bis 3 nm. Die Verteilung der Porengrößen von MT50 und MT100 ist in beiden Fällen im trockenem

Zustand breiter als im feuchten. Offensichtlich liegt der Grund für die deutlich höhere spezifische Oberfläche der MT100-Cellulose gegenüber der MT50 in der Anwesenheit von deutlich kleineren Poren in letzterer. Der Unterschied von mittlerer Porengröße und Porengrößenverteilung zwischen trockenen und feuchten Proben kann als Folge eines teilweisen Kollapses und der Verschmelzung der kleinen Poren während des Trocknungsprozesses gedeutet werden.



**Abb. 4-14:** SAXS Kurven von MT100 in trockenem und feuchtem Zustand (Linien (a) bzw. (b)), korrigiert für ein Schlitz-Längen-Profil mit Hilfe der IFT Methode. Die gepunkteten Linien sind Anpassungskurven für eine bimodale Porengrößenverteilung. Die Kurve (b) wurde zur besseren Darstellbarkeit um einen Faktor von  $10^2$  multipliziert.



**Abb. 4-15:** Volumengewichtete Porengrößenverteilung von MT100 im trockenen und feuchten Zustand (Kurven (a) bzw. (b)). Die durchgehenden Linien wurden mit Hilfe der IFT-Methode bestimmt und stimmen mit den durchgehenden SAXS-Kurven in Abb. 4-14 überein. Die gepunkteten Linien entsprechen den gepunkteten Anpassungskurven in Abb. 4-12. Die Kurven (b) wurden wegen der besseren Darstellbarkeit vertikal verschoben.

Die Ergebnisse der besten Kurvenanpassung an die SAXS-Ergebnisse – unter Verwendung von Gl. 3-33 – sind in Abb. 4-12 für MT50 sowie in Abb. 4-14 für MT100 als gepunktete Kurven angegeben. Man erkennt, dass das einfache Modell der Kurvenanpassung mit Hilfe von zwei

Schulz-Zimm-Verteilungen nicht optimal passt, jedoch die allgemeine Form der Kurven in erster Näherung wiedergegeben werden kann.

Die Porengrößenverteilung, die mit Hilfe dieser Anpassungen erhalten werden, sind in Abb. 4-13 für MT50 und in Abb. 4-15 für MT100 dargestellt (jeweils gepunktete Linien). Im Gegensatz dazu sind die Radien der kleineren Poren bei MT50 größer als bei MT100 (40 nm MT50 trocken, 40 nm MT50 feucht, 32 nm MT100 trocken, 35 nm MT100 feucht). Des Weiteren fällt auf, dass die kleineren Poren bei den feuchten Proben größer sind als im trockenen Zustand (5.0 nm MT50 trocken, 3.0 nm MT50 feucht, 4.0 nm MT100 trocken, 2.6 nm MT100 feucht). Die Polydispersitäten wurden mit Werten zwischen 0.30 und 0.35 für eine konsistente Kurvenanpassung konstant gehalten, um mehrdeutige Ergebnisse zu vermeiden. Das Volumenverhältnis der großen zu den kleinen Poren liegt für MT50 bei 0.98 (trocken) bzw. bei 1.14 (feucht), d.h. die totalen Volumina der kleinen und großen Poren sind nahezu gleich. Der Einfluss des Trocknungsprozesses ist somit auf beide Porentypen identisch. Im Gegensatz dazu liegt das Volumenverhältnis von MT100 bei 0.68 (trocken) bzw. 0.37 (feucht).

Der Vergleich der Ergebnisse für die feuchten Proben von SAXS- und ISEC-Untersuchungen, zeigt, dass für MT100 die Porod-Durchmesser  $D_p$  mit 9.1 nm niedriger im Vergleich zum mittleren Durchmesser der ISEC mit 41 nm sind. Die bimodale Verteilung der MT100 (mit IFT-Prozedur) zeigt einen überaus hohem Anteil an kleinen Poren ( $N_1/N_2 = 0.38$ ), was darauf hindeutet, dass vermutlich ein sehr hoher Anteil an geschlossenen Poren vorhanden ist. Diese können mit anderen Methoden als SAXS nicht erfasst werden. Vergleicht man diese Werte mit denen der ISEC, wo unter bestimmten Voraussetzungen ( $r_g$  und Spaltmodell) ebenfalls bimodale Verteilungen erhalten werden, so zeigen jeweils die Werte für große Poren gute Übereinstimmung mit denen SAXS ( $R_{1,SAXS} = 35$  nm;  $R_{S1,ISEC} = 34.1$  nm). Der deutlich größere Volumenanteil der großen Poren bei der ISEC (80%), sowie stark abweichende Werte bei den kleinen Poren ( $R_{2,SAXS} = 2.6$  nm;  $R_{S2,ISEC} = 6$  nm) deuten wiederum auf einen hohen Anteil geschlossener Poren hin.

Hingegen liegen bei MT50 die Porod-Durchmesser  $D_p$  mit 7.4 nm deutlich näher an den Durchmessern der ISEC ( $D_S = 12.8$  nm bei monomodaler Verteilung). Insgesamt scheint der Anteil der geschlossenen Poren im Vergleich zu MT100 deutlich niedriger zu liegen, da auch das Verhältnis  $N_1/N_2$  mit 1.14 signifikant höher ist. Vergleicht man die bimodalen Verteilungen (z.B.  $r_\eta$  und Spaltmodell) so stimmen jeweils die kleinen Porengrößen gut überein ( $R_{1,SAXS} = 3.0$  nm;  $R_{S2,ISEC} = 2.4$  nm), die großen liegen jedoch deutlich auseinander ( $R_{2,SAXS} = 40.0$  nm;  $R_{S2,ISEC} = 9.8$  nm). Grundsätzlich scheint es sowohl bei der ISEC als auch bei SAXS nur



bedingt möglich zu sein, das reale Porensystem der Perlcellulose mit den jeweiligen Modellsystemen ausreichend genau anzupassen. Sowohl mit der Stickstoffsorption als auch der Hg-Porosimetrie – Methoden bei denen jeweils direkt die Porengrößenverteilung erhalten wird – werden breite und vor allem stark asymmetrische Verteilungen erhalten. Diese lassen sich nur unzureichend mit einer (bimodalen) logarithmischen Normalverteilung im Falle der ISEC bzw. einer bimodalen Schulz-Zimm-Verteilung (SAXS) anpassen.

**Tab. 4-9:** Übersicht über die mittels SAXS-Messungen bestimmten Eigenschaften der Perlcellulosen MT50 und MT100 in trockenem (Lösungsmittelaustausch) und in feuchtem Zustand. Auswertung erfolgte mit Porod-Methode ( $l_p$ ,  $D_p$ ), sowie mit der IFT-Methode nach Glattner (Annahme: Kugelförmige Poren, Bimodale Verteilung)

Proben	MT50 trocken	MT50 feucht	MT100 trocken	MT100 feucht
$S_{BET} [m^2 g^{-1}]$	120.9		201.4	
$S_{ISEC} [m^2 g^{-1}]$		355		367
$S_{SAXS} [m^2 g^{-1}]$	$109.2 \pm 7.8$	$161.1 \pm 8.9$	$220.9 \pm 5.3$	$417.0 \pm 12.6$
$l_p [nm]$	$5.5 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.2$	$5.9 \pm 0.1$	$3.1 \pm 0.1$
$D_p [nm]^{a-}$	$7.14 \pm 0.4$	$7.4 \pm 0.4$	$11.8 \pm 0.2$	$9.1 \pm 0.3$
$R_1 [nm]$	40.0	40.0	32.0	35.0
$\sigma_1 [nm]$	0.3	0.3	0.3	0.3
$R_2 [nm]$	5.0	3.0	4.0	2.6
$\sigma_2 [nm]$	0.35	0.35	0.35	0.35
$N_1 / N_2$	0.98	1.14	0.68	0.38

<sup>a-</sup>  $D_p = l_p / (1 - \phi)$  [94]

#### 4.2.8 Zusammenfassung der Partikelcharakterisierung

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurden für die Perlcellulose MT50 mittlere Durchmesser (arithmetisches Mittel) von 33.6 nm (feucht) bzw. 25.9 nm (getrocknet) bestimmt. Bei der Perlcellulose MT100 liegen die Werte bei 42.6 nm (feucht) bzw. 28.7 nm (trocken).

Die Ergebnisse der Porenanalyse an MT50 und MT100 können wie folgt zusammengefasst werden: Die mittels  $N_2$ -Adsorptionsmessungen bestimmten mittleren Porenweiten betragen für MT50 7.3 nm bzw. 15.9 nm für MT100. Die Peakmaxima der Verteilungskurven liegen mit 10.5 nm bzw. 34.2 deutlich höher. Die  $N_2$ -Desorptionskurve liefert hingegen aufgrund von „Pore-Blocking“-Effekten zu kleine Werte und ist somit zur Charakterisierung der untersuchten Perlcellulosen ungeeignet. Die mittels Quecksilberporosimetrie bestimmten mittleren Porengrößen liegen mit 13.0 nm (MT50) und 24.4 nm (MT100) hingegen über den Werten der  $N_2$ -Adsorption. Aufgrund des unteren Limits von ~3.6 nm und der extremen Druckbelastung,

ist diese Methode für die vorliegenden Cellulosepartikel nur bedingt geeignet. Mit der ISEC wurde für MT50 ein mittlerer Porendurchmesser von 12.7 nm erhalten, für MT100 ein Wert von 41.7 nm. Diese Werte stimmen relativ gut mit denen der N<sub>2</sub>-Adsorption überein – insbesondere wenn die Peakmaxima verglichen werden. Unterschiede ergeben sich hier vor allem dadurch, dass bei der ISEC im Gegensatz zur Stickstoffsorption die feuchten Celluloseperlen untersucht werden. Unterschiede zwischen den beiden Methoden deuten somit auf ein Schrumpfen der Poren während des Trocknungsprozesses hin. Der größte Vorteil der ISEC ist der Umstand, dass hier die Proben unter realen chromatographischen Einsatzbedingungen untersucht werden können, wodurch insbesondere dynamische Transportprozesse miterfasst werden.

Eine Sonderstellung unter den verwendeten Methoden nimmt die SAXS ein. Es ist die einzige Methode, bei der sowohl trockene als auch feuchte Partikel untersucht werden können. Dies macht sie besonders interessant für die Untersuchung von Trocknungsprozessen. Der Hauptnachteil der SAXS bei der Untersuchung von Gelmaterialien für die Flüssigchromatographie ist der Umstand, dass hier auch nicht zugängliche (d.h. geschlossene) Poren erfasst werden. Gegenüber den anderen Methoden ist zudem der hohe apparative Aufwand und die aufwändig Auswertung zu nennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei den untersuchten Perlcellulosen um polymere Netzwerke mit breitverteilten Porengrößen handelt. Insbesondere beim Produkt MT100 ist jedoch die Mehrzahl der kleineren Poren geschlossen und steht somit für chromatographische Trennprozesse nicht zur Verfügung. Beim Produkt MT50 besteht ein Teil der Poren zudem aus Tintenfassporen. REM-Aufnahmen deuten hier des Weiteren auf größere Transportkanäle hin, die ins Partikelinnere führen.

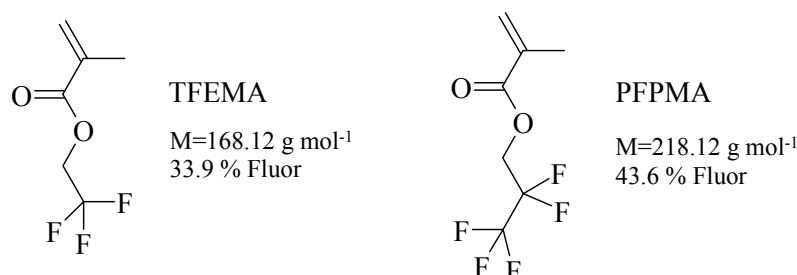
Im Hinblick auf die Charakterisierungsmethoden kann geschlussfolgert werden, dass die beiden am besten geeigneten Methoden zur Charakterisierung von porösen Celluloseperlen für chromatographische Anwendungen die Stickstoffsorption und die ISEC darstellen.

### 4.3 Modifizierung von Perlcellulose

Die Untersuchungen an den nativen Perlcellulosen haben gezeigt, dass diese grundsätzlich für chromatographische Anwendungen geeignet sind. Es konnten keine signifikanten Wechselwirkungen mit Polysacchariden und Proteinen beobachtet werden. Insbesondere die Perlcellulose MT50 kann demnach zur Trennung von Proteinen im Bereich von 5 000 bis 40 000 g mol<sup>-1</sup> eingesetzt werden. Damit ist diese besonders zur Charakterisierung von Insulinproben geeignet ( $M_{\text{Insulin-Monomer}}$ : ~ 5 800 g mol<sup>-1</sup>;  $M_{\text{Insulin-Hexamer}}$ : ~ 35 000 g mol<sup>-1</sup>). Für weitere Modifizierungen wird deshalb ausschließlich dieses Produkt verwendet.

#### 4.3.1 Pfropfcopolymerisation der Perlcellulose

Die Fluorierung der Perlcellulosen sollte zunächst durch radikalische Pfropfcopolymerisation von Vinylmonomeren erfolgen. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie in wässriger Lösung durchgeführt werden kann. Allerdings erfolgt die Polymerisation in saurem Medium (pH 1-2), wodurch die Gefahr eines hydrolytischen Celluloseabbaus besteht. Die Porenstruktur der Perlcellulose kann dadurch beeinträchtigt bzw. zerstört werden.



**Abb. 4-16:** Verwendete Monomere 2,2,2-Trifluorethylmethacrylat (TFEMA) und 3,3,3,2,2-Pentafluorpropylmethacrylat (PFPMA).

Als Monomere wurden 2,2,2-Trifluorethylmethacrylat (TFEMA) und 3,3,3,2,2-Pentafluorpropylmethacrylat (PFPMA) ausgewählt. Beide sind kommerziell verfügbar und besitzen zudem ähnliche chemische Eigenschaften wie Acrylsäuremethylester bzw. Methacrylsäuremethylester, von denen in der Literatur bereits Cer-initiierte Pfropfungen auf Cellulose beschrieben wurden [95,96,97]. Insbesondere *Gupta* konnte zeigen, dass es möglich ist, Acrylsäuremethylester mit nur minimalen Anteilen von unerwünschten Homopolymeren auf Cellulose zu pfropfen [50]. *Klemm* erwähnte [52] die Möglichkeit fluorierte Methacrylate auf Cellulose zu pfropfen. Des Weiteren ist bekannt, dass es möglich ist TFEMA mittels Cer(IV)-Ionen auf Polyvinylalkohol zu pfropfen [98].

Zunächst erfolgte eine Homopolymerisation von TFEMA und PFPMA [99]. Diese werden als Referenzproben für die anschließende Charakterisierung der Pfpfocopolymere – insbesondere für die IR-Spektroskopie – benötigt. Die Synthese wurde in wasserfreiem Dioxan mit Azobisisobutyronitril (AIBN) als Initiator durchgeführt. Untersuchungen mittels SEC in THF ergaben eine Molmasse für Poly(TFEMA) von  $190\,000\text{ g mol}^{-1}$  (Standardkalibrierung mit Polystyrol; Säulenmaterial: SDV von PSS).

Die Pfpfocopolymerisation der Perlcellulose erfolgte unter heterogenen Bedingungen mit Hilfe einer salpetersauren Cer(IV)ammoniumnitrat-Lösung als Initiator. Eine Übersicht der Pfpfocoproducte ist in Tab. 6-2 gegeben.

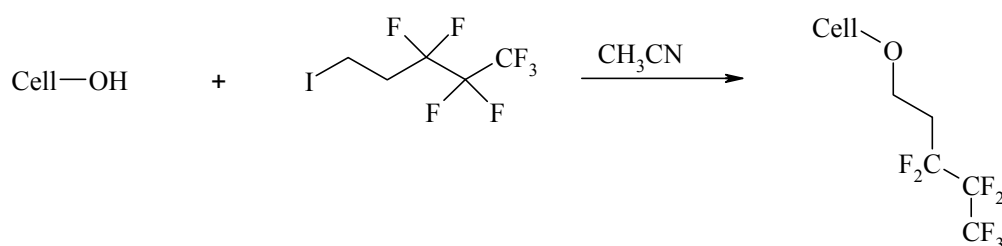
Nach Extraktion eines Teils des Produkts mit Aceton wurden nur beim Produkt MT50-g-PTFEMA 1 nennenswerte Anteile an Homopolymeren festgestellt. Dies liegt darin begründet, dass das Monomer hier im Überschuss zugesetzt wurde ( $c_{PTFEMA} = 1.0\text{ mol l}^{-1}$ ). Bei den folgenden Synthesen mit Monomerkonzentrationen von  $\leq 0.2\text{ mol l}^{-1}$  wurden hingegen nur Spuren von unerwünschtem Homopolymer nachgewiesen. Für die weiteren Experimente konnten deshalb die nicht extrahierten Cellulose-Pfpfocopolymere direkt eingesetzt werden. Durch den Verzicht auf die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln kann eine Zerstörung oder Beeinträchtigung der Porenstruktur somit ausgeschlossen werden.

#### 4.3.2 Polymeranaloge Umsetzung

Ein Problem der Pfpfocopolymerisation besteht darin, dass es durch die Fixierung von Polymerketten auf der Oberfläche der Cellulosepartikel zur Bildung stark hydrophober „Inseln“ kommen kann. Mit Hilfe von polymeranalogen Umsetzungen ist es hingegen möglich, dass nur niedermolekulare Verbindungen auf die Oberfläche gepfropft werden. Dadurch soll eine homogenere Verteilung der Fluorgruppen auf der Celluloseoberfläche erzielt werden, so dass auf jede hydrophobe Gruppe ausreichend viele OH-Gruppen in direkter Nachbarschaft kommen. Es ist zudem davon auszugehen, dass die Porenstruktur der Perlcellulose höchstens geringfügig verändert wird. Die Synthese sollte wenn möglich in Heterophase durchgeführt werden, da ein Lösen bzw. eine Suspendierung der Cellulose in organischen Lösungsmitteln deren Poren-Struktur zerstören könnte. Deshalb sollte als Lösungsmittel nach Möglichkeit Wasser eingesetzt werden.

Eine einfache und effektive Methode zur Modifizierung von Perlcellulose würde die Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid darstellen. Es ist jedoch bekannt dass der negative induktive Effekt der Fluorsubstituenten zu einer erhöhten Reaktivität der Carbonylgruppen führt, was sich insbesondere am stark verringerten  $\text{pK}_s$ -Wert der Trifluoressigsäure mit einem

Wert von 0.23, gegenüber der Essigsäure mit einem  $pK_s$  von 4.75 zeigt. Deshalb ist anzunehmen dass das Produkt für den Einsatz in neutralen bzw. schwach sauren oder basischen wässrigen Medien nicht ausreichend hydrolysebeständig ist. Eine alternative Methode zur Veresterung stellt die Umsetzung mit fluorhaltigen Iodalkanen unter Ausbildung einer Etherbindung dar. In Abb. 4-17 ist die polymeranaloge Umsetzung von 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-5-iod-pentan (HFIP) mit Perlcellulose dargestellt. Das Sauerstoff-Atom der resultierenden Etherbindung ist durch zwei  $CH_2$ -Gruppen von den fluorhaltigen Gruppen getrennt, wodurch eine bessere Beweglichkeit der Fluorgruppe gewährleistet wird.



**Abb. 4-17:** Modifizierung von Cellulose durch polymeranaloge Umsetzung mit 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-1-iod-pentan in Acetonitril.

Einen Nachteil dieser Methode stellt jedoch der Umstand dar, dass die Umsetzung nur in aprotischen Lösungsmitteln – z. B. Acetonitril – durchgeführt werden kann und nicht wie bei der Cer-initiierten Pfropfung in wässriger Lösung. Hierzu müssen die Perlcellulosen im Lösungsmittel suspendiert werden, ohne dass deren Porenstruktur beeinträchtigt wird. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Zum Einen kann mit den in Wasser gequollenen Perlcellulosen ein Lösungsmittelwechsel direkt auf Acetonitril erfolgen: Es werden zunächst Mischungen aus Acetonitril und Wasser zur Cellulose gegeben und nach einiger Zeit wieder mittels Vakuumfiltration abgesaugt, schließlich wird die Cellulose in reinem Acetonitril suspendiert und erneut abgesaugt. Dadurch wird der Lösungsmittelverbrauch deutlich reduziert und der Arbeitsaufwand ist geringer da die Perlcellulose nicht umständlich getrocknet werden muss. Der Nachteil ist jedoch, dass immer ein gewisser Anteil Wasser im Produkt zurückbleibt, was unter Umständen zu einer Hydrolyse des eingesetzten Iodids führen kann. Aus diesem Grund wurde für die Synthesen mittels Lösungsmittelaustausch getrocknete Perlcellulosen eingesetzt (vgl. 4.2.1). Werden diese vor der Umsetzung im Vakuumtrockenschrank getrocknet und anschließend direkt in wasserfreiem Acetonitril suspendiert, kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktionsmischung nur noch sehr geringe Mengen an Restwasser enthält. Mit Hilfe von vorausgegangenen ISEC-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mittels Lösungsmittelaustausch getrocknete Cellulosepartikel nach erneuter Quellung in Wasser keine

nennenswerten Unterschiede in der Porenstruktur im Vergleich zum Ausgangsmaterial aufweisen (vgl. Kap. 4.3.3.c). Sie können somit bedenkenlos für die Synthese eingesetzt werden.

Die Umsetzungen mit HFIP erfolgten unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Reaktionsmischungen wurden zunächst 7 h bei 80°C, anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch schrittweises Waschen mit Acetonitril, Acetonitril/Wasser-Mischungen und reinem Wasser.

#### 4.3.3 Charakterisierung von modifizierten Perlcellulose-Proben

##### a) IR-Spektroskopie

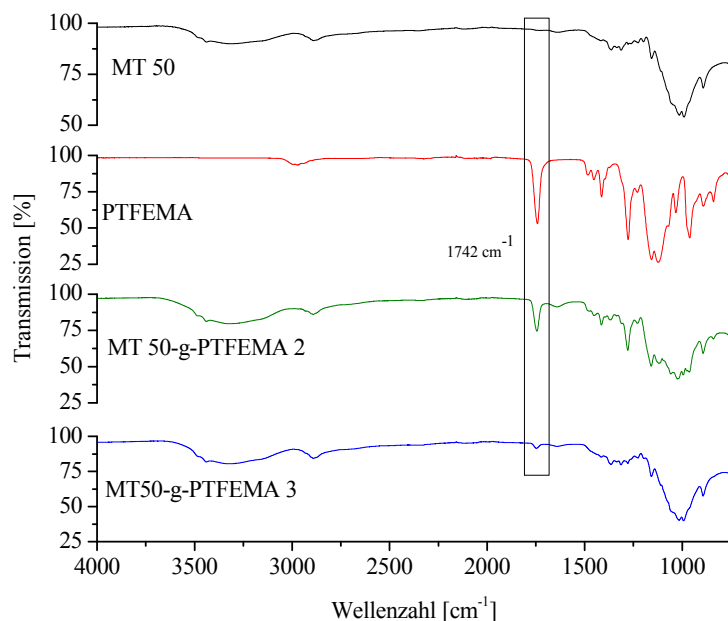
Zur Quantifizierung der aufgepfropften Menge an Fluorpolymer wurde in erster Linie die FT-IR-Spektroskopie eingesetzt. Eine direkte Bestimmung des Fluors mit dieser Methode erwies sich jedoch als nicht möglich, da die Absorptionsbanden des Fluors im *Fingerprint*-Bereich zwischen 1000 und 1400 cm<sup>-1</sup> liegen. Die Schwingungsbande des Fluors bei 1278 cm<sup>-1</sup> ist zwar bei hohen Fluorgehalten auch in den Pfcopolymere zu finden (vgl. Abb. 4-18 MT50-g-PTFEMA 2), eine Quantifizierung ist jedoch nicht möglich, da der Peak von weiteren Banden des Homopolymers als auch der Cellulose überlagert wird. Bei kleineren Fluorgehalten wird er ganz vom Cellulosespektrum überdeckt. Ebenso wenig können die beiden starken Banden der Skelett-Valenzschwingungen (gekoppelt mit inneren CH-Deformationsschwingungen) bei 1158 und 1124 cm<sup>-1</sup> genutzt werden, da in diesem Bereich auch die Cellulose eine sehr starke Absorption aufweist. Hingegen kann die charakteristische C=O-Bande (C=O Streckschwingung) des Esters bei 1742 cm<sup>-1</sup> hervorragend für eine Auswertung eingesetzt werden. Die Cellulose zeigt in diesem Frequenzbereich keinerlei Absorption und auch in den Homopolymeren werden keine benachbarten Peaks beobachtet, die diese Bande überlagern könnten.

Zunächst wurden die Proben-Spektren unter Verwendung einer ATR-Einheit (ATR: abgeschwächte Totalreflexion; engl. attenuated total reflection) vom Typ Golden Gate aufgenommen <sup>-a-</sup>. Es zeigte sich jedoch, dass mit dieser Methode keine Quantifizierung der

---

<sup>-a-</sup> Bei der ATR werden die Proben ohne weitere Präparation von einem Saphirstempel auf eine Kristalloberfläche aufgepresst. Der Lichtstrahl tritt dabei schräg durch den Kristall – bei der eingesetzten Einheit ist dies ein Diamant – und trifft anschließend auf die Probe, wobei eine Totalreflexion auftritt. Voraussetzung für die ATR ist, dass der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel  $\alpha_g$  ist ( $\sin \alpha_g = n_{\text{Kristall}} / n_{\text{Probe}}$  wobei  $n_{\text{Kristall}} > n_{\text{Probe}}$ )

Polymeranteile erfolgen kann. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Schichtdicke der Probe und der Anpressdruck nur unzureichend reproduziert werden können.



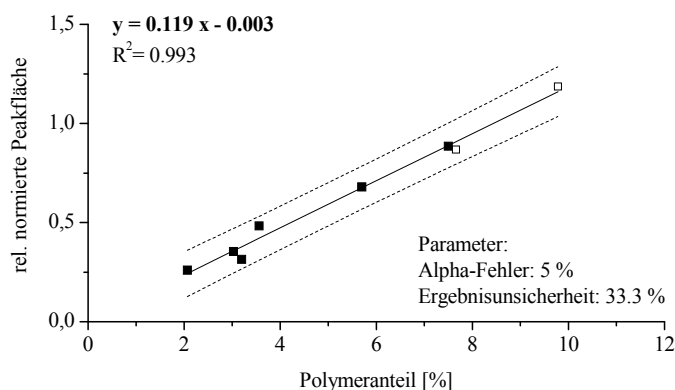
**Abb. 4-18:** IR-Spektren von reiner Perlcellulose (schwarz), Polyfluoracrylat PTFEMA (rot) sowie fluormodifizierten Perlcellulosen (grün bzw. blau); Die Probenpräparation erfolgte mit einem *Golden Gate* System.

Für eine Quantifizierung der Pfropfanteile wurden deshalb Messungen an KBr-Presslingen durchgeführt. Zunächst wurde hierzu eine Kalibrierkurve erstellt, wobei Mischungen aus getrockneter Perlcellulose MT50 und Homopolymer PTFEMA bzw. PFPMA hergestellt wurden. Die Spektren wurden auf das Adsorptionsmaximum der Cellulose bei  $1021\text{ cm}^{-1}$  normiert. Dadurch ist es möglich, Fehler, die bei der Einwaage sowie durch inhomogene Zusammensetzung der Presslinge entstehen, so weit wie möglich zu minimieren. Die Auswertung erfolgte anschließend über die Peakfläche der C=O-Bande bei  $1742\text{ cm}^{-1}$ .

Um auszuschließen, dass noch Restlösungsmittel die Messungen verfälscht, wurde zur Kontrolle reine Perlcellulose mit Aceton versetzt und anschließend wie die Polymer-Perlcellulose-Mischungen behandelt. Im IR-Spektrum konnte anschließend kein charakteristischer Peak der Aceton-C=O-Gruppe im Bereich von  $1715\text{ cm}^{-1}$  mehr nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass sich das Lösungsmittel komplett abdampfen lässt.

Für die Kalibrierkurve wurden insgesamt sechs Mischungen von MT50 mit PTFEMA und zwei mit PFPMA untersucht. Der Anteil des synthetischen Polymers lag dabei im Bereich zwischen 2 und 10 %. Trägt man die normierte Peakflächen der C=O-Bande ( $1742\text{ cm}^{-1}$ ) über den Polymeranteil auf, so ergibt sich eine lineare Regressionsgerade. Werden die Steigungen jeweils unabhängig für Mischungen mit PTFEMA bzw. PFPMA durch den Nullpunkt

bestimmt, so erhält man in beiden Fällen annähernd gleiche Werte (0.119 bzw. 0.118). Man kann deshalb davon ausgehen, dass beide Typen von Pfpfocopolymeren mit nur einer linearen Kalibrierkurve mit ausreichender Genauigkeit charakterisiert werden können (Steigung: 0.119). Die Auswertung erfolgte entsprechend den DIN-Normen 32645 [100] und 38402 [101]. Die Nachweisgrenze liegt bei einem synthetischen Polymeranteil von 0.882 %, die Erfassungsgrenze bei einem Wert von 1.762 %.



**Abb. 4-19:** Lineare Kalibrationsfunktion mit Prognoseintervalle für 99 % Signifikanz zur Bestimmung des Pfpfanteils der Copolymere. Untersucht wurden Mischungen aus MT50 mit PTFEMA (■) bzw. PFPFMA (□); Jeweils 2.5 mg einer Perlcellulose- Polymer-Mischung wurden zur Herstellung eines KBr-Presslings verwendet.

Da nur jeweils 2.5 mg Polymermischung zur Herstellung der KBr-Presslinge eingesetzt wurden, ist die Messung anfällig für eine inhomogene Verteilung des Polymers in der Cellulosematrix, worauf vermutlich die Abweichung von der Regressionsgeraden zu erklären ist. Zudem werden bei Polyacrylat-Anteilen kleiner 5 % die untersuchten Peaks sehr klein, so dass besonders darauf zu achten ist, dass die Basislinie jeweils korrekt und in gleicher Weise eingefügt wird (vgl. Abb. 4-18).

Für die Pfpfprodukte MT50-g-PTFEMA 3 und MT50-g-PTFEMA 4 wurde so ein synthetischer Polymeranteil von  $(3.8 \pm 0.9) \%$  bzw.  $(7.5 \pm 1.0) \%$  bestimmt. Die Probe MT50-g-PTFEMA 2 wurde für weitere Experimente nicht mehr verwendet. Auf Grund ihres hohen Polyfluoracrylat-Anteils von  $(44.5 \pm 4.5) \%$  ist sie für chromatographische Anwendungen mit wässrigen Eluenten deutlich zu hydrophob. Für das Pfpfocopolymer MT50-g-PFPFMA 1 wurde  $w_{IR} = (15.8 \pm 1.5) \%$  bestimmt. Dieser Wert liegt vermutlich zu hoch.

Die Bestimmung des Fluorgehalts der polymeranalog modifizierten Produkte HFP-MT50 ist mittels IR-Spektroskopie nicht möglich, da aufgrund der Etherstruktur keine C=O-Gruppen vorhanden sind. Die Fluorgruppen sind – auf Grund der starken Absorption der Cellulose im Bereich zwischen  $1000$  und  $1500 \text{ cm}^{-1}$  – nicht eindeutig zuzuordnen. Deswegen – und auch auf

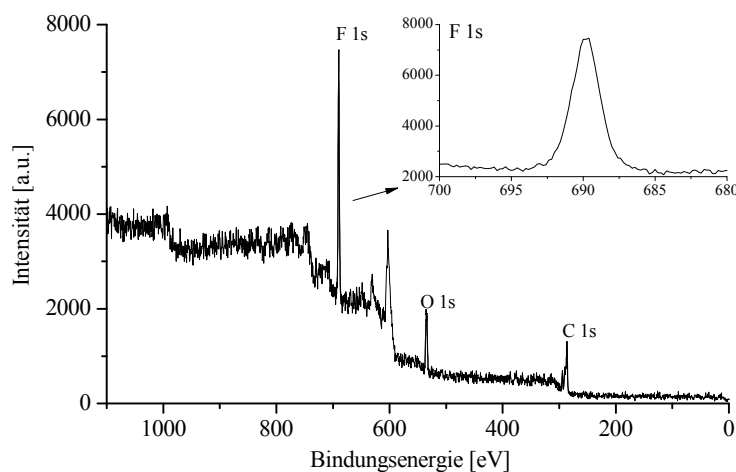


Grund des relativ großen Fehlers der IR-Methode – sind weitere Methoden zur Bestimmung des Fluorgehalts nötig.

*b) Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (XPS) und Elementaranalyse*

Aufgrund der relativ hohen Unsicherheit der IR-Methode wurden die Proben zusätzlich mit Hilfe der Röntgeninduzierten Photoelektronenspektroskopie (XPS) sowie der Fluorelementaranalyse <sup>-a-</sup> analysiert. Auf Einzelheiten dieser Methoden soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Nähere Informationen sind in den Publikationen von Watts und Wolstenholm über XPS [102] sowie von Skoog und West über die potentiometrische Bestimmung von Fluoridionen [103] zu finden. Die Ergebnisse der Messungen sind zusammen mit den Ergebnissen IR-Untersuchungen in Tab. 4-10 dargestellt.

Der grundlegende Unterschied der angewandten Analysenmethoden ist der, dass bei der XPS in erster Linie die Oberfläche der Partikel erfasst wird. Bei der Elementaranalyse wird hingegen ein chemischer Aufschluss durchgeführt, so dass die Gesamtheit der Probe erfasst wird. Werden bei der XPS deutlich größere Werte als mit Elementaranalyse und IR-Spektroskopie erhalten, so deutet dies darauf hin, dass die Modifizierung in erster Linie auf der Partikeloberfläche erfolgt ist.



**Abb. 4-20:** XPS-Spektrum des Homopolymers Poly(2,2,2-Trifluorethylmethacrylat); Bindungsenergien der einzelnen Elemente sind 689.6 eV für Fluor F<sub>1s</sub>, 534.7 eV für Sauerstoff O<sub>1s</sub> und 286.5 eV für Kohlenstoff C<sub>1s</sub>.

Bei der Untersuchung des Homopolymers Poly(TFEMA) mit XPS, wurde ein Fluorgehalt von 24.6 % bestimmt. Der tatsächliche Fluorgehalt der Probe (berechnet aus der Summenformel) liegt jedoch bei 33.9 %. Somit wird mittels XPS ein um 27% zu niedriger Fluorgehalt

<sup>-a-</sup> Fluorbestimmung erfolgte durch einen Soda-Pottasche Aufschluss bei 850° im geschlossenen Platintiegel und anschließender potentiometrischen Bestimmung von Fluorid mit Hilfe einer fluoridsensitiven Elektrode (Verwendung eines TISAB-Puffers; pH 7.8)

bestimmt. Die Berechnung des synthetischen Massenanteils  $w_{XPS}$  wird deshalb auf den experimentell bestimmten Fluorgehalt der XPS bezogen ( $w_{XPS} = (F_{XPS, Ppropf} / F_{XPS, Homo}) \cdot 100\%$ ). Für das Homopolymer Poly(PFPMA) konnten hingegen keine XPS-Messungen durchgeführt werden. Die Berechnung des synthetischen Massenanteils von MT50-g-PPFPMA 1 wurde deshalb mit Hilfe des theoretischen Werts des Homopolymers von 43.6 % durchgeführt.

Sind die Fluorwerte der XPS vergleichbar bzw. kleiner als die der Elementaranalyse und der IR-Spektroskopie, so kann davon ausgegangen werden, dass die Proben gleichmäßig und nicht nur auf der Oberfläche fluoriert worden sind. Dies ist bei den Proben MT50-g-PTFEMA 3 und MT50-g-PTFEMA 4 und bei HFP-MT50 der Fall.

**Tab. 4-10:** Ergebnisse der XPS-Messungen, Fluor-Elementaranalyse (EA) und IR-Spektroskopie der fluormodifizierten Perlcellulosen im Vergleich mit den nativen Celluloseperlen und den Homopolymeren. *C*: Kohlenstoffanteil; *O*: Sauerstoffanteil; *F*: Fluoranteil; *w*: synthetischer Massenanteil.

Probe	$C_{XPS}$ [%]	$O_{XPS}$ [%]	$F_{XPS}$ [%]	$w_{XPS}$ [%]	$F_{EA}$ [%]	$W_{EA}$ [%]	$w_{IR}$ [%]
MT50 LMA2	61.0	39.0	0				
Poly(TFEMA)	59.3	16.1	24.6				
Poly(PFPMA)	38.6 <sup>-a-</sup>	14.7 <sup>-a-</sup>	43.6 <sup>-a-</sup>				
MT50-g-PTFEMA 2	59.9	21.7	18.3	73	--	--	45
MT50-g-PTFEMA 3	69.4	29.9	0.8	3.3	1.80	5.3	3.8
MT50-g-PTFEMA 4	60.4	38.0	1.3	5.3	1.97	5.8	7.5
MT50-g-PPFPMA 1	47.6	29.4	13.0	30	1.90	4.2	16
HFP-MT50 1	63	37	n.n. <sup>-b-</sup>	n.n. <sup>-b-</sup>	1.36	2.0	--
HFP-MT50 2	65	34	0.5	0.7	0.42	0.6	--

<sup>-a-</sup> theoretische Werte

<sup>-b-</sup> nicht nachweisbar

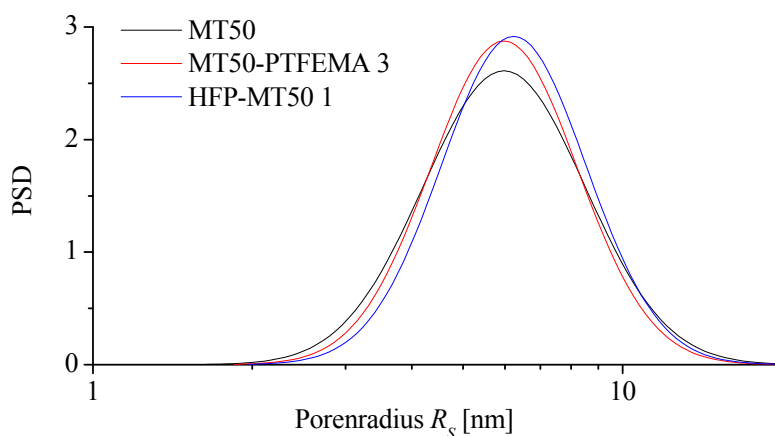
Bei der Probe MT50-g-PPFPMA 1 zeigen die Ergebnis der Elementaranalyse ( $w_{EA} = 4.2\%$ ) und der XPS ( $w_{XPS} = 30\%$ ), dass die Modifizierung bevorzugt auf der Partikeloberfläche stattgefunden hat. Wird angenommen, dass die Ppropfausbeute *PA* ähnlich hoch ist wie bei den Proben MT50-g-PTFEMA 3 und MT50-g-PTFEMA 4 (38 % bzw. 44%;  $PA = (w_{IR} / w_{100\%}) \cdot 100\%$ ), so wird für MT50-g-PPFPMA 1 ein synthetischer Massenanteil von ca. 8 % erwartet. Mit der IR-Spektroskopie wird jedoch ein deutlich höherer Wert ( $w_{IR} = 16\%$ ) erhalten. Dies deutet auf eine Oberflächensensitivität der IR-Methode hin, d. h. oberflächennahe Gruppen werden demnach gegenüber Gruppen im Bulk überbewertet. Als Grund für eine bevorzugte Modifizierung der Perlcellulose auf der Partikeloberfläche beim Einsatz von PFPMA, kann die höhere Hydrophobie des Monomers genannt werden. Die

zusätzlichen fluorhaltigen Gruppen könnten dazu geführt haben, dass während der Pfpfcopolymerisation weniger Monomer in die Poren der hydrophilen Cellulose diffundiert ist.

Bei der Probe MT50-g-PTFEMA 1 hingegen sind die hohen Fluoranteile in erster Linie auf die starke Modifizierung zurückzuführen. Auf die Partikel wurde so viel Polymer gepfopft, dass das XPS-Spektrum große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des Homopolymers aufweist.

### c) *Inverse Größenausschlusschromatographie (ISEC)*

Die Modifizierung von Perlcellulose ist nur dann sinnvoll, wenn ausgeschlossen werden kann, dass die Porenstruktur der Partikel signifikant verändert wird. Diese Gefahr besteht insbesondere dann, wenn organische Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril für die Modifizierung eingesetzt werden, wie dies bei der polymeranalogen Umsetzung von 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-5-iod-pentan mit Perlcellulose der Fall ist. Aus diesem Grund wurde jeweils ein ausgewähltes Produkt aus der Cer-initiierten Modifizierung und der polymeranalogen Umsetzung mittels ISEC hinsichtlich einer möglichen Änderung der Porenstruktur untersucht.



**Abb. 4-21:** Oberflächenbezogene Porenverteilung der Porenradien durch inverse Größenausschlusschromatographie; Sondenmoleküle: Pullulan 180 -  $1.54 \cdot 10^6$  kD ( $r$ - $M$ -Beziehung basierend auf  $r_\eta$ ); Auswertung mittels PoroCheck Software von PSS; Modell: Zylinderporen mit monomodaler Porengrößenverteilung.

Mit den Proben MT50-g-PTFEMA 3 und HFP-MT50 1 wurden Säulen gepackt (Länge des Gelbetts jeweils ca. 5 cm) und mit Pullulanstandards bekannter Molmasse unter SEC-Bedingungen untersucht. Die Auswertung erfolgte wiederum mit Hilfe der PoroCheck-Software, wobei Zylinderporen als Modell angenommen wurden. Die  $M$ - $r$ -Beziehung basiert auf den Viskositätsradien  $r_\eta$  (vgl. Kap. 3.4.3). Die oberflächen- und volumenbezogenen mittleren Porenradien, der Parameter  $\sigma$  für die Breite der Verteilung sowie die Porenvolumen-

Fraktionen der einzelnen Produkte im Vergleich zum Ausgangsprodukt sind in Tab. 4-11 dargestellt.

Die Mittelwerte der Porenradien sowie deren Verteilung (Abb. 4-21) machen deutlich, dass zwischen den einzelnen modifizierten Perlcellulosen kein signifikanter Unterschied besteht.

Die geringfügigen Abweichungen der Porenvolumenfraktionen der untersuchten Proben liegen ebenfalls im Rahmen der Methodengenauigkeit. Es kann geschlussfolgert werden, dass es durch die beiden unterschiedlichen Modifizierungen zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Porenstruktur der Perlcellulose kommt.

**Tab. 4-11:** ISEC von fluormodifizierten Perlcellulosen; Ergebnisse basierend auf  $r_\eta$  von Pullulan ( $K = 0.0153$ ;  $a = 557$ ); Porenmodell: Zylinderporen;  $R_S$ : oberflächenbezogener Porenradius;  $R_V$ : volumenbezogener Porenradius;  $\sigma$ : Breite der Verteilung;  $PVF$ : Porenvolumenfraktion ( $V_p/(V_0+V_p) \cdot 100$ ).

Probe	$R_S$ [nm]	$R_V$ [nm]	$\sigma$ [nm]	$PVF$ [%]
MT50	$6.36 \pm 0.39$	$7.2 \pm 0.3$	$2.3 \pm 0.8$	42.1
MT50-g-PTFEMA 3	$6.29 \pm 0.33$	$7.0 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.7$	39.4
HFP-MT50 1	$6.55 \pm 0.30$	$7.2 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.7$	44.8

#### 4.4 *Anwendungsuntersuchungen an modifizierten Perlcellulosen*

Zur Induzierung einer Protein-Rückfaltung vom  $\beta$ -Faltblatt zur  $\alpha$ -Helix ist es nötig, dass die eingesetzten Proteine in direkten Kontakt mit der fluorierten Oberfläche der Cellulose treten. Dies ist unter Standard-SEC-Bedingungen nicht der Fall, chemische Wechselwirkungen sind hier im Gegenteil nicht erwünscht.

Aus diesem Grund wurde zunächst mit eine Reihe von geeigneten Referenzproteinen Untersuchungen durchgeführt, um zu testen unter welchen Bedingungen – d.h. insbesondere hinsichtlich Eluenten-Eigenschaften wie pH-Wert, Pufferkonzentration etc. – minimale bzw. maximale Wechselwirkungen zwischen Analyt und Säulenmaterial auftreten.

##### 4.4.1 *Adsorptionsuntersuchungen mit Proteinen*

Die ausgewählten Proteine besitzen alle einen isoelektrischen Punkt im Bereich von  $\beta$ -Amyloid (5.4) und Rinderinsulin (5.3). Die Molmassen sind ausreichend groß, dass die Proteine aus der Mehrzahl der Gelporen ausgeschlossen werden. Dadurch kann gewährleistet werden, dass allen eine gleichgroße Oberfläche für eventuelle Wechselwirkungen zur Verfügung steht. Deutlich kleineren Proteine steht hingegen eine wesentlich größere Oberfläche zur Verfügung, da sie selbst in kleinste Poren diffundieren können, wodurch ein direkter Vergleich der Protein-Gel-Wechselwirkungen nicht mehr möglich ist. Die Adsorptionsneigung hängt dadurch nur vom Eluent und den chemischen Eigenschaften wie z. B. dem isoelektrischen Punkt oder der Hydrophobizität der Proteine ab.

**Tab. 4-12:** Ausgewählte Proteinstandards für Adsorptionsuntersuchungen (GE Bioscience);  $R_s$ : Stokesradius; pI: isoelektrischer Punkt.

Nr.	Protein	Molmasse [mol l <sup>-1</sup> ]	$R_s$ [nm]	pI
1	Thyroglobulin	669 000	8.50	4.5
2	Ovalbumin	43 000	3.05	4.7
3	Albumin	67 000	3.70	4.8
4	Catalase	232 000	5.22	5.4
5	Aldolase	171 000	4.81	6.1

Für die Adsorptionsuntersuchungen an Proteinen wurde zum Einen die unmodifizierte Perlcellulose MT50 sowie die mittels Pfropfcopolymerisation modifizierte fluorhaltige Perlcellulose MT50-g-PTFEMA 3 ausgewählt. Dafür wurde jeweils eine Chromatographiesäule (Durchmesser 1 cm; Säulenlänge ca. 5 cm) mit dem Cellulosematerial

gepackt und anschließend auf verschiedene Lösungsmittelgemische konditioniert. Von den in Tab. 4-12 angegebenen Proteinen wurden jeweils 50 µl Lösung – mit einer Konzentration von jeweils ca. 1.5 g l<sup>-1</sup> in die SEC-Anlage über einen Autosampler – sowohl mit als auch ohne Trennsäule – injiziert. Die Wiederfindung  $w$  der Proteine wurde aus dem Quotienten der Peakflächen mit und ohne Säule berechnet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 276 nm:

**Gl. 4-5:** 
$$w = Fl_{\text{mit Säule}} / Fl_{\text{ohne Säule}} \cdot 100\%$$

Da jeweils die gleiche Lösung injiziert worden ist, spielen Fehler die bei der Einwaage der Proben entstehen (z.B. Restfeuchtigkeit der Standards) keine Rolle. Einzig Fehler, die auf den Autosampler zurückzuführen sind und Einflüsse bei der Auswertung – z.B. durch Setzen der Basislinie und der Integrationsgrenzen – spielen dann noch eine Rolle. Dieser Gesamtfehler liegt erfahrungsgemäß im Bereich von  $\pm 5\%$ .

Folgende Faktoren wurden für die Adsorptionsuntersuchungen variiert:

- Art des Puffersystems (z. B. Citrat-Phosphat-Puffer, Ammoniumpuffer)
- pH-Wert des Puffersystems (pH im Bereich 2-10)
- Art und Konzentration von zusätzlichen Salzen (z. B. NaCl, NaNO<sub>3</sub>)

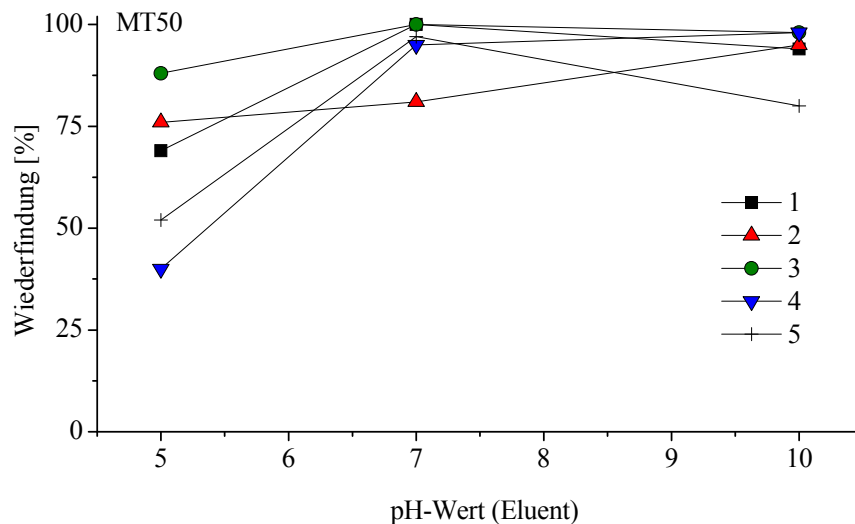
#### a) *Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorption*

Zunächst wurde die Wiederfindung der Proteine mit einer unmodifizierten MT50-Phase in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Es wurden Proteine mit pI-Werten im Bereich von Insulin (5.3) bzw. Amyloid A $\beta$  (5.4) ausgewählt. Im neutralen und sauren Bereich wurde zunächst ein Citrat-Phosphat-Puffer eingesetzt, im basischen ein NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl-Puffer, wobei jeweils 0.2 M NaNO<sub>3</sub> zugesetzt wurden (vgl. Kap. 6.3).

Für pH-Werte von 7 und 10 konnte eine nahezu vollständige Wiederfindung bestimmt werden, der Mittelwert lag bei 96 % für pH 7 bzw. bei 93 % für pH 10. Neben den fünf in Abb. 4-22 dargestellten Proteinen wurde zusätzlich Fibrinogen (pI 5.1) untersucht. Bei pH 7 und 10 wurde jeweils eine Wiederfindung von nahezu 100 % erhalten. Für pH 5 liegen allerdings keine Ergebnisse vor, da Fibrinogen unter diesen Bedingungen denaturiert.

Im schwach sauren Milieu bei pH 5 zeigen die Proteine jedoch Wechselwirkungen, die mittlere Wiederfindung beträgt nur 63 %. Eine Erklärung könnte sein, dass die Cellulose einen geringen Anteil an geladenen anionischen Gruppen wie z. B. Carboxylgruppen enthält. Bei höheren pH-Werten sind die Proteine nach außen negativ geladen. Es ist bekannt, dass regenerierte Cellulose – vor allem wenn sie wie die verwendeten Perloza Perlcellulosen mit dem

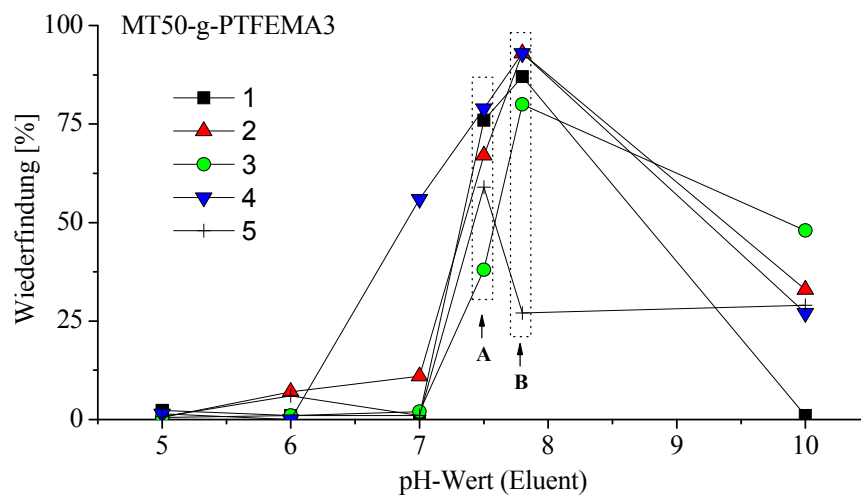
Viskoseverfahren hergestellt wurden - einen geringen Anteil an negativen Ladungen trägt. Dabei handelt es sich nach *Fras et al.* [104] vor allem um Carboxylgruppen mit einem pK-Wert von  $\sim 3.5$ . Dies entspricht dem pK-Wert von Uronsäuren, z.B. der Glucuronsäure (Glucose bei der die C6-Hydroxylgruppe zur Carbonsäure oxidiert wurde). Dadurch können die deutlich höheren Wiederfindungen bei höheren pH-Werten auf repulsive Kräfte zwischen Proteinen und cellulosischem Gelmaterial zurückzuführen sein.



**Abb. 4-22:** Adsorption von Proteinen auf MT50 in Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten ( $\text{NaNO}_3$  0.2 M; Pufferkonzentration 10 mM, pH 5 bzw. 7 Citrat-Phosphat-Puffer; pH 10  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer). Verwendete Proteinstandards: 1: Thyroglobulin (pI 4.5); 2: Ovalbumin (pI 4.7); 3: Albumin (pI 4.8); 4: Catalase (pI 5.4); 5: Aldolase (pI 6.1).

Bei der fluormodifizierten Perlcellulose MT50-g-PTFEMA 3 ist die Adsorptionsneigung bei pH 5 noch deutlich stärker ausgeprägt. Im Schnitt liegt die Wiederfindung bei nur 1 %, was einer nahezu vollständigen Adsorption entspricht. Der Grund hierfür dürfte die größere Hydrophobie des Gelmaterials sein, so dass hydrophobe Wechselwirkungen noch stärker in Erscheinung treten können. Da die untersuchten Proteine isoelektrische Punkte im Bereich von 5 - 6 ausweisen, ist deren Nettoladung nach außen bei pH 5 und 6 am geringsten. Es treten somit keine oder nur geringe repulsive Kräfte auf. Zudem ist die Hydrathülle um die Proteine nahe dem pI am kleinsten. Dies führt dazu, dass hydrophobe Wechselwirkungen bei einem pH  $< 7$  stark zunehmen.

Die geringsten Wechselwirkungen konnten bei einem pH-Wert von 7.5 ohne zusätzliches Salz gefunden werden. Der Einfluss der Salzkonzentration wurde anschließend in einer weiteren Messreihe untersucht.



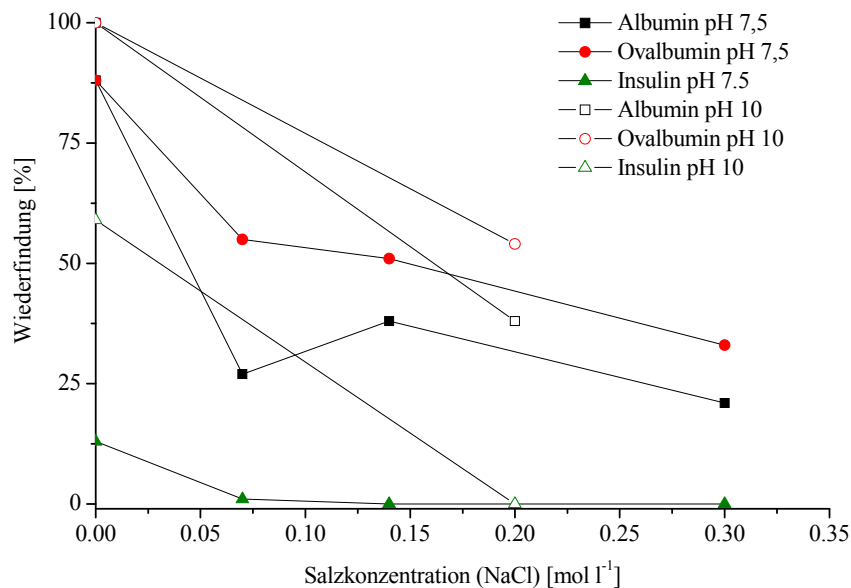
**Abb. 4-23:** Adsorption von Proteinen auf MT50-g-PTFEMA 3 in Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten (Eluent:  $\text{NaNO}_3$  0.2 M; Phosphat-Citrat-Puffer 10 mM; außer A: Phosphat-Puffer 10 mM, NaCl 0.14 M; B: reiner Phosphat-Puffer 10 mM, kein zusätzliches Salz). 1: Thyroglobulin (pI 4.5); 2: Ovalbumin (pI 4.7); 3: Albumin (pI 4.8); 4: Catalase (pI 5.4); 5: Aldolase (pI 6.1).

#### b) Einfluss der Salzkonzentration auf die Adsorption

Wie in Abb. 4-23 deutlich zu erkennen ist, wurden die geringsten Adsorptionstendenzen bei der geringsten Salzkonzentration festgestellt. Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen auf einer fluormodifizierten Perlcellulose (MT50-g-PTFEMA 3) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration wurden jeweils Albumin, Ovalbumin sowie Rinderinsulin auf einer kurzen Säule (5 cm) chromatographisch untersucht. Die Messungen wurden bei pH-Werten von 7.5 und 10.0 durchgeführt. Auf weitere Untersuchungen bei niedrigem pH-Wert wurde verzichtet, da hier alle Proteine sehr starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zeigen. Es zeigte sich, dass bei fluorierten Gelphasen eine starke Abhängigkeit der Adsorption von der Salzkonzentration gegeben ist. Diese tritt umso stärker in Erscheinung je niedriger der pH-Wert des Eluenten ist. Bei pH 10 besitzen die Proteine nach außen eine negative Gesamtladung, da der pH deutlich über dem isoelektrischen Punkt liegt (Kap. 3.1.1). Nimmt man nun an, dass sich zudem geringe Mengen an negativen Ladungen - z. B. durch Carboxylgruppen - auf der Partikeloberfläche befinden, so wird eine Adsorption durch repulsive Wechselwirkungen verhindert. Wird jedoch die Elektrolytkonzentration stark erhöht, so bewirkt dies eine Ladungsabschirmung. Dies hat nun vermutlich zur Folge, dass verstärkt hydrophobe Wechselwirkungen an Einfluss gewinnen.



Es zeigt sich, dass die Adsorption der Proteine dann am geringsten ist, wenn die abstoßenden Ladungen zwischen Protein und Celluloseoberfläche am höchsten ist. Das ist dann der Fall, wenn die Salzkonzentration am niedrigsten ist und die Differenz zwischen pH des Lösungsmittels und pI der Proteine am größten ist. Hierdurch lässt sich u.a. die stärkere Adsorption des Insulins (pI 5.5) im Gegensatz zum Albumin (pI 4.8) erklären. Über die Hydrophobizität des Insulin und des Albumin lässt sich dieser Effekt nicht erklären.



**Abb. 4-24:** Adsorption von Proteinen auf MT50-g-PTFEMA 3 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (NaCl; Pufferkonzentration 10mM, pH 7.5 Phosphatpuffer; pH 10 NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl Puffer).

Werden noch stärker saure Eluenten eingesetzt - z. B. HCl-Lösungen mit pH 2 - so erfolgt ebenfalls eine komplette Adsorption der Proteine auf dem Gelmaterial. Dieser Befund deckt sich mit der oben genannten Vermutung: Bei pH 2 sind die sauren Gruppen auf der Celluloseoberfläche protoniert und somit nicht geladen. Insulin selbst ist bei pH < pI kationisch geladen. Es wirken somit keine nennenswerten elektrostatischen Kräfte, die hydrophoben Wechselwirkungen führen zur Adsorption.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Adsorption von Proteinen auf den untersuchten Perlcellulose-Materialien stark pH-abhängig ist. Die höchsten Wiederfindungen werden im pH Bereich zwischen 7.5 – 8.0 mit Phosphatpuffern erhalten. Zudem ist die Adsorptionsneigung von Proteinen von der Salzkonzentration stark abhängig. Entgegen den Erfahrungen mit SEC-Messungen an Polyelektrolyten, bei denen meist größere Mengen an Salz dem Eluenten zugesetzt werden müssen um unerwünschte Wechselwirkungen zu unterdrücken (typische Konzentrationen: 0.1 – 0.5 M), werden in diesem Fall bei niedrigen Salzgehalten die höchsten

Wiederfindungen bestimmt. Von den untersuchten Proteinen zeigt Insulin unter allen Bedingungen die stärksten Adsorptionstendenzen.

#### 4.4.2 *Aggregationsuntersuchungen mit Insulinlösungen*

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen von (modifizierten) Perlcellulosen wurde Rinderinsulin – gewonnen aus der Bauchspeicheldrüse - mit einem Zinkgehalt von ca. 0.5 % eingesetzt (Sigma Aldrich; spezifische Aktivität:  $\geq 27 \text{ IU mg}^{-1}$ )<sup>a-</sup>. Im Gegensatz zu Human- und Schweineinsulin zeigt Rinderinsulin die höchste Aggregationsneigung, dieses ermöglicht eine deutliche Verkürzung der Versuchszeiten. Zudem ist es deutlich preiswerter als die zuvor genannten Spezies.

Der Schwerpunkt wurde auf Untersuchungen unter sauren Bedingungen gelegt. Diese wurden in erster Linie bei einem pH-Wert von zwei durchgeführt, was mehrere Gründe hat:

- Im neutralen pH-Bereich zeigt Insulin nur eine geringe Löslichkeit in der Pufferlösung, für einige Untersuchungsmethoden wie z. B. die Röntgenkleinwinkelstreuung ist jedoch eine relativ hohe Konzentration (d.h.  $> 5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) nötig, die z.B. bei pH 7 nicht erreicht werden kann.
- Die Aggregationsneigung ist im sauren Milieu deutlich erhöht, wodurch die Dauer der Experimente zusätzlich verkürzt werden kann.
- Saure Insulinlösungen besitzen für die Herstellung und Verarbeitung von Insulinpräparaten eine entscheidende Rolle. Rinderinsulin kann z. B. durch saure Extraktion gewonnen werden; wichtige Reinigungsschritte des Insulins erfolgen ebenfalls in saurer Lösung.

Zu beachten ist, dass die einzelnen Messreihen, soweit möglich, mit derselben Insulinlösung durchgeführt wurden. Dies ist deshalb von Bedeutung, da schon geringste Unterschiede – z. B. Verunreinigungen, die als Kondensationskeime wirken – zu stark abweichenden Ergebnissen führen können [24]. Für alle Versuche zur Insulinaggregation wurde zudem dasselbe Lösungsmittel verwendet, so dass der pH-Wert konstant blieb.

#### a) *SEC-Methodenentwicklung*

Um den Einfluss modifizierter Perlcellulosen auf die Aggregation von Insulin untersuchen zu können, wird zunächst eine robuste chromatographische Methode zur genauen Quantifizierung

---

<sup>a-</sup> IU: International Unit (deutsch auch IE), entspricht für Insulin der biologischen Aktivität von genau 1/22 mg hochreinem kristallinem (Zink-)Insulin (bzw. 45.5  $\mu\text{g}$ ); die gleiche Bedeutung hat eine USP Einheit, wobei es sich bei „USP“ um ein eingetragenes Markenzeichen der *United States Pharmacopeial Convention, Inc* handelt.

von Insulin in Lösung benötigt. Dadurch soll gewährleistet werden, dass die Konzentration von Insulin auch bei niedermolekularen Verunreinigungen sowie in unterschiedlichsten Puffersystemen einwandfrei und schnell bestimmt werden kann. Voraussetzung für den Einsatz der SEC hierfür ist wiederum, dass keine Wechselwirkungen des Insulins mit dem Trennmaterial auftreten. Als Chromatographiesäulen wurden zwei HEMA-Bio Säulen von Polymer Standard Service (PSS) mit Porositäten von 100 und 40 Å gewählt (je 300 x 8 mm).

**Tab. 4-13:** Einfluss der Eluenten-Zusammensetzung auf Wiederfindung und Peak-Asymmetrie von Insulin auf HEMA-Bio Säulen (PSS; 100 + 40 Å; 300x8 mm)

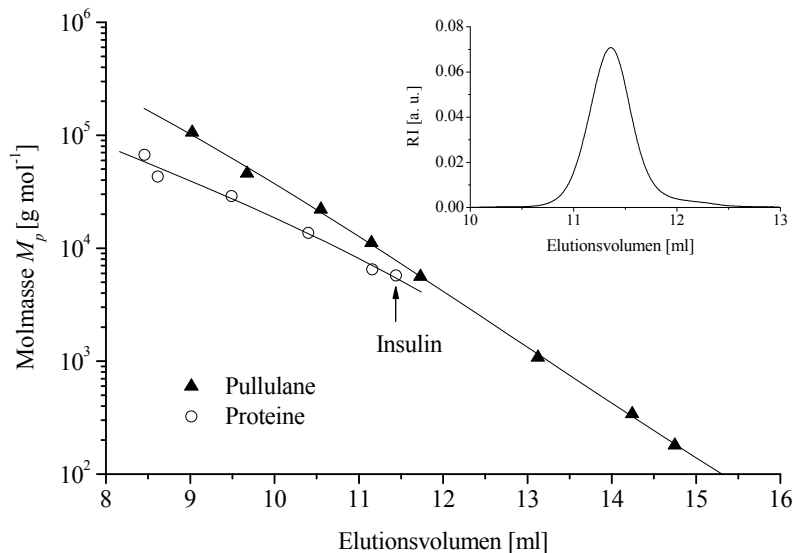
Eluent	Wiederfindung	Peak-Asymmetrie
	[%]	[-]
Phosphatpuffer 10 mM pH 7.5 + 0.14 M NaCl	0	--
HCl 10 mM pH 2	2	--
HAc 1 M	62	0.14
HAc 2.5 M + 5% Acetonitril	71	0.26
HAc 2.5 M + 25% Acetonitril	100	1.05

Als Bewertungsgrundlage für die Entwicklung der Methode dienen erfahrungsgemäß die beiden Parameter Wiederfindung und Peak-Asymmetrie. Liegt insbesondere die Peak-Asymmetrie für eine engverteilte Probe um 1.0 ( $\pm 0.1$ ), so kann von einer wechselwirkungsfreien Trennung ausgegangen werden. Ein starkes Tailing – d.h. eine Peak-Asymmetrie deutlich kleiner als eins – deutet auf starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial hin. Zunächst wurde ein neutraler Phosphatpuffer (pH 7.5) mit 0.14 M NaCl verwendet. Hier wurde jedoch kein Insulin-Peak detektiert, was eine komplette Adsorption des Insulins auf dem Säulenmaterial bedeutet. Dasselbe Ergebnis wird in 10 mM HCl-Lösung (pH 2.0) erzielt.

Wird hingegen eine Essigsäure-Lösung (HAc) mit einer Konzentration von 1 mol l<sup>-1</sup> verwendet, so wird ein Insulinpeak detektiert. Dieser ist jedoch stark in Richtung hoher Elutionsvolumina verschoben und weist eine sehr niedrige Peak-Asymmetrie auf Grund eines starken Tailings auf. Peakform und Wiederfindung verbessern sich mit 2.5 M Essigsäure und dem Zusatz von 5% Acetonitril als Co-Eluent. Optimale Ergebnisse werden jedoch erst bei Verwendung von 25% Acetonitril erzielt.

Es zeigte sich jedoch, dass unter diesen Bedingungen keine Insulin-Aggregate untersucht werden können. Es wird jeweils nur ein einzelner Peak erhalten. Wird eine Kalibrierkurve mit Proteinstandards erstellt, so liegt die Molmasse des monomeren Insulins (5 800 g mol<sup>-1</sup>) direkt auf der angepassten Kurve (Abb. 4-25). Dies zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen

Insulin größtenteils als Monomer vorliegt. Die Tatsache dass die Protein-Kalibrierkurve unterhalb der Pullulan-Kalibrierkurve liegt – d.h. dass die Proteine hin zu kleineren Elutionsvolumen und somit höheren Molmassen verschoben sind – deutet darauf hin, dass die Proteine als aufgeweitete Knäuel, also nicht in nativer, globulärer Form sondern denaturiert vorliegen.



**Abb. 4-25:** SEC-Kalibrierkurven von Proteinen und Pullulan-Standards (HEMA-Bio 100 + 40 Å; Eluent 2.5M HAc + 25% v/v Acetonitril); Kleines Bild: Elugramm von Insulin.

#### b) *Aggregation von Insulin in saurem Milieu*

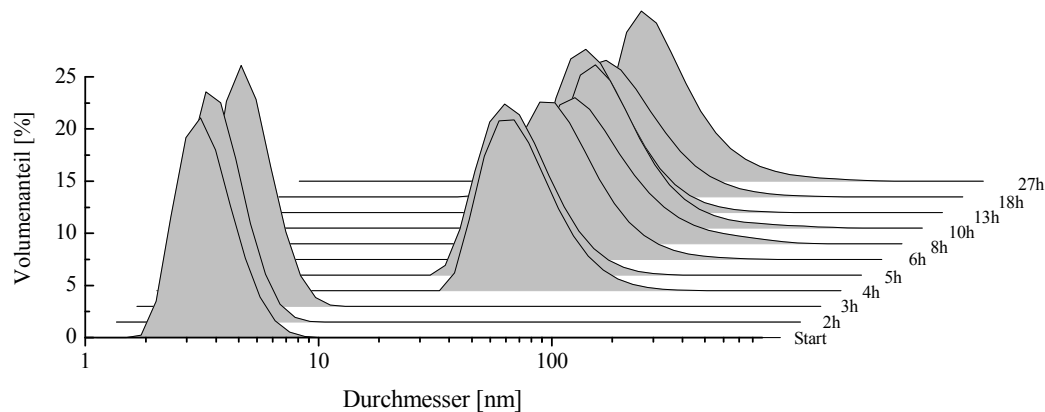
Da die Aggregation von Proteinen in der Regel von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird, sollte zunächst das Aggregationsverhalten der reinen Insulinlösung untersucht werden. Dies geschieht zunächst in saurem Milieu bei pH 2 sowie bei  $T = 37^\circ\text{C}$ . Durch Schütteln wird zudem eine deutliche Vergrößerung der Wasser/Luft-Grenzfläche erzeugt. Da Luft im Vergleich zum Wasser stark hydrophobe Eigenschaften besitzt, reichert sich dadurch Insulin mit seinen hydrophoben Seitenketten an der Phasengrenzfläche an und beschleunigt somit die Aggregation beträchtlich. Dies ist auch der Grund, dass unter solchen Bedingungen die Aggregationsneigung mit abnehmender Insulinkonzentration zunehmen kann, da sich dadurch prozentual ein größerer Anteil des Peptids an der Luft-Wasser-Grenzfläche anreichern kann.

Die Aggregationsuntersuchungen wurden in ähnlicher Weise wie von *Sluzky et al.* [105] beschrieben durchgeführt (vgl. Kap. 6.5). Die von Zeit zu Zeit entnommenen Proben wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht und anschließend filtriert ( $0.2\ \mu\text{m}$ ). Die Bestimmung und Charakterisierung des nicht aggregierten Insulins erfolgt anschließend mittels

SEC (HEMA-Bio Säulen, Porosität 100 + 40 Å, Eluent 2.5 M Essigsäure in Wasser + 25 % Acetonitril) und DLS. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Integration des SEC-UV-Peaks bei 276 nm. Die nicht-aggregierte Insulin-Stammlösung dient dabei als Referenz. Die (Insulin-)Wiederfindung  $w$  wird hier wie folgt definiert:

**Gl. 4-6:** 
$$w = Fl_{\text{Probe}} / Fl_{\text{Stammlösung}} \cdot 100\%$$

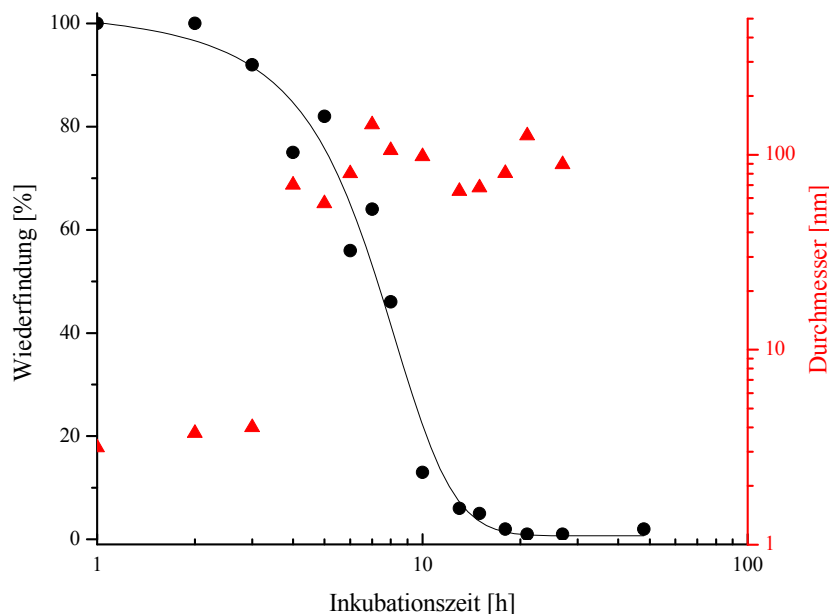
Die Unsicherheit der Analysenmethode liegt im für die SEC typischen Bereich von 5-10 %.



**Abb. 4-26:** Untersuchung der Aggregation von Insulin durch Inkubation bei 37°C und pH 2 mittels DLS. Aufgetragen ist die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von den Inkubationszeiten. Proben wurden vor der Messung zur Abtrennung hochmolekularer Fibrillen filtriert (0.2 µm GHP Acrodisc-Filter von Pall).

An Hand der DLS-Messungen ist deutlich zu erkennen, dass zunächst nur Partikel (Monomere bzw. Oligomere) im Bereich von 2 bis 5 nm Durchmesser vorliegen (vgl. Abb. 4-26). Dies entspricht den Durchmessern von monomerem, dimerem und hexamerem Insulin. Eine Identifikation der einzelnen Spezies ist mit der DLS in diesem Größenbereich jedoch nicht möglich. Nach 4 h sind jedoch nur noch Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 70 nm zu erkennen. Niedermolekulares Insulin ist ab diesem Zeitpunkt nicht mehr zu detektieren. Der schlagartige Anstieg der Partikeldurchmesser nach 3 h ist vermutlich auf eine spontane Aggregation aufgrund kooperativer Aggregationsprozesse zurückzuführen. Bis zu einer Dauer von 7 h nimmt die Partikelgröße mit abnehmender Wiederfindung zu (vgl. Abb. 4-27). Mit zunehmender Dauer des Experiments ist jedoch keine weitere signifikante Erhöhung der Partikelgröße festzustellen. Dies kann damit erklärt werden, dass die Konzentration zu diesem Zeitpunkt stark abnimmt wodurch die Messgenauigkeit abnimmt. Nach ca. 7 h ist 50 % des Insulins aggregiert – diese Zeit kann auch als Halbwertszeit  $t_{50\%}$  bezeichnet werden. Nach 13 h liegt die Wiederfindung bei weniger als 10%. Das Konzentrationsprofil lässt sich gut mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion beschreiben.

Es fällt auf, dass nach 4 h mit der DLS ausschließlich Aggregate mit einem Durchmesser größer als 20 nm detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt mit der SEC jedoch noch eine Wiederfindung von 80 % bestimmt werden kann, ist davon auszugehen dass neben Aggregaten noch reines Insulin in der Lösung vorhanden ist. Bei Vorliegen von sehr großen und somit stark streuenden Partikeln können kleinere Partikel nicht mehr detektiert werden: Dies liegt daran dass das Lichtstreusignal proportional zur 6. Potenz des Partikelradius ist. Da die DLS-Messung von einer Software gesteuert wird, regelt diese zum Schutz der Photodiode die Laserleistung in Abhängigkeit von der Gesamt-Streuintensität der Probe. Wird beispielsweise nicht-aggregiertes Insulin untersucht, so liegt die Laserintensität des verwendeten Gerätes bei ca. 90 %, bei aggregierten Proben hingegen wird die Intensität automatisch auf unter 1 % gedrosselt. Unter diesen Bedingungen ist jedoch monomeres Insulin nicht mehr zu detektieren.



**Abb. 4-27:** Aggregation von Insulinlösungen bei 37 °C (1g l<sup>-1</sup> in HCl 10 mM); Kurven-Anpassung der Insulin-Wiederfindung (●) mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion ( $y=A_2+(A_1-A_2)/(1+\exp((x-x_0)/dx))$ );  $A_1$ :107;  $A_2$ : 0.68543;  $x_0$ :6.94982;  $dx$ : 2.22429). Die angegebenen Durchmesser des Insulins (▲) sind die Mittelwerte der Intensitätsverteilung aus der DLS (in nm).

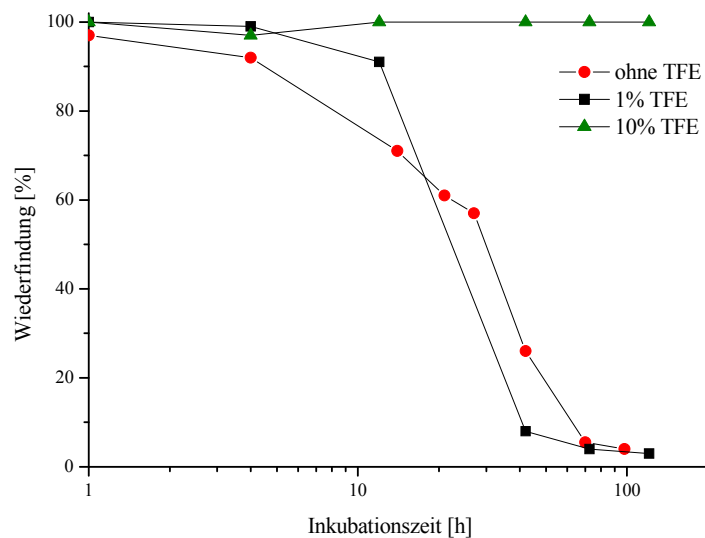
#### c) *Einfluss von 2,2,2-Trifluorethanol auf die Insulinaggregation im sauren Milieu*

Bevor Untersuchungen an fluorierten Perlcellulosen durchgeführt wurden, sollte zunächst getestet werden, inwiefern Fluormoleküle in Kombination mit OH-Gruppen in nächster Nähe einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Insulin zeigen. Als Modellsubstanz wurde 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) ausgewählt. Dieses wurde in der Literatur bereits als Reagenz

beschrieben, mit dem Insulin-Protofibrillen aufgelöst werden können [10]. Vergleichbar mit den fluormodifizierten Perlcellulosen, besitzt TFE Fluorgruppen in unmittelbarer Nachbarschaft von OH-Gruppen.

Als Lösungsmittel wird jeweils 10 mM wässrige HCl-Lösung verwendet, zu der definierte Mengen an TFE zugesetzt werden (bezogen auf das Volumen). Bei 1 % TFE zeigt sich noch kein signifikanter Einfluss. Die Aggregationsneigung ist vergleichbar mit Insulin ohne Fluorzusatz, nach ca. 30 h sind 50 % des Insulins aggregiert. Wird jedoch die Konzentration auf 10 % erhöht so zeigt sich noch nach 125 h keine nennenswerte Aggregation des Insulins.

Umgekehrt wurde getestet, ob bereits aggregiertes Insulin mit Hilfe von TFE wieder aufgelöst werden kann. Die Messung der Partikelgröße erfolgt mit Hilfe der DLS. Ein Zusatz von 10 % TFE zu einer bereits aggregierten Probe zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Größe der Insulinaggregate. Wird die bereits aggregierte Probe erneut über Nacht geschüttelt, so wird trotz 10 %igem TFE Zusatz vielmehr ein weiterer Anstieg der Aggregatgröße beobachtet.



**Abb. 4-28:** Einfluss von 2,2,2-Trifluorethanol auf das Aggregationsverhalten von Insulin (22°C; 1g l<sup>-1</sup> in HCl 10 mM + TFE (v/v)).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TFE in geringer Konzentration keinen Einfluss auf die Aggregation besitzt. Hingegen wird in großer Konzentration die Aggregation wirksam unterdrückt. Ähnliches ist aus der Literatur für u.a. Amyloide bekannt [9]. Grundsätzlich ist TFE somit in der Lage, die Aggregation wirksam zu verhindern. Eine Umkehrung der Aggregation durch nachträgliche Zugabe von TFE konnte unter den gewählten Bedingungen allerdings nicht nachgewiesen werden.

d) *Einfluss modifizierter Perlcellulose auf die Insulinaggregation unter sauren Bedingungen*

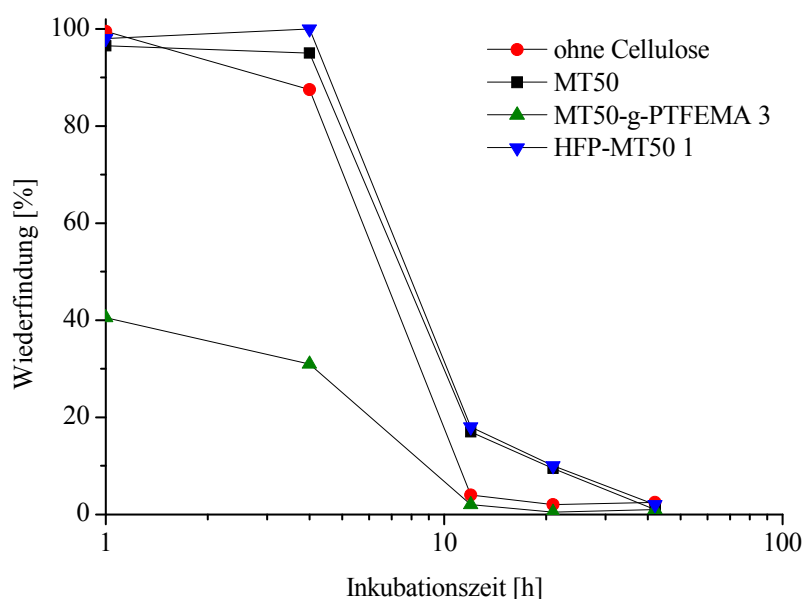
Um den Einfluss von (modifizierten) Perlcellulosen auf die Insulinaggregation zu untersuchen, wurde Insulin zusammen mit den gequollenen Cellulose-Partikeln ebenfalls durch Inkubation bei 37 °C zur Aggregation gebracht. Auf 0.75 ml Insulinlösung (1 g l<sup>-1</sup>, pH 2.0) wurden jeweils 100 ± 0.5 mg der feuchten, gequollenen Perlcellulose eingewogen – mit einem Feststoffgehalt von jeweils ca. 33 %. Als Referenz wurde das Aggregationsverhalten der reinen Insulinlösung im Probenglas ohne Zusatz eines Feststoffs untersucht.

Die reine Insulinlösung zeigte ein nahezu identisches Verhalten wie in der vorhergegangenen Versuchsreihe bei 37 ° (vgl. Abb. 4-27), die geringfügig längere Inkubationszeit liegt im Bereich der Messungenauigkeit des Verfahrens. Dies und der steilere Kurvenverlauf im Bereich des Wendepunkts ist darauf zurückzuführen, dass nur jeweils fünf Proben je Messreihe angesetzt wurden und nicht 15 Proben wie in der ersten Messreihe. Die Halbwertszeit  $t_{50\%}$  der Probe liegt hingegen ebenfalls im Bereich von 7-8 h.

Die native Perlcellulose zeigt bei 37 °C keinen signifikanten Einfluss auf das Aggregationsverhalten. Die Wiederfindung des Insulins mit nativer Cellulose liegt zwar geringfügig unterhalb der Wiederfindung der Probe mit reinem Insulin, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant und liegt im Bereich der Messgenauigkeit. Bei der gepfropften Probe MT50-g-PTFEMA 3 ist hingegen schon nach 1 h eine deutliche Abnahme der Wiederfindung auf nur noch 40 % zu verzeichnen. Messungen mit der dynamischen Lichtstreuung zeigen für diese Probe jedoch nach 1 h noch keinerlei nennenswerte Aggregation. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die starke Erniedrigung der Wiederfindung zu diesem frühen Zeitpunkt ausschließlich auf Adsorptionsphänomene zurückzuführen ist. Diese beruhen vermutlich auf starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Insulin und Bereichen mit hohen Fluoracrylatkonzentrationen. Eventuell vorhandene kationische Restladungen – Cer-Ionen aus der Pfropfpolymerisation – können hierfür nicht verantwortlich sein, da Insulin bei pH 2 eine positive Gesamtladung trägt. In die Cellulosematrix inkorporierte Cer-Ionen würden somit eine Adsorption deshalb eher verhindern.

Zeigt sich wie in diesem Fall schon zu Beginn eine starke Adsorption so ist es sinnvoll, den Wert für  $t_{50\%}$  auf die Wiederfindung nach 1 h zu beziehen, um so das Aggregationsverhalten des Insulins mit anderen Proben sinnvoll vergleichen zu können: Die Abnahme der Wiederfindung von 40 % nach 1h auf 20 % erfolgte nach 6 h, d.h. der Wert für  $t_{50\%}$  und somit die Aggregationsgeschwindigkeit ist nur geringfügig kleiner als bei der Referenzprobe ohne Cellulose mit  $t_{50\%}$  von 7-8 h.





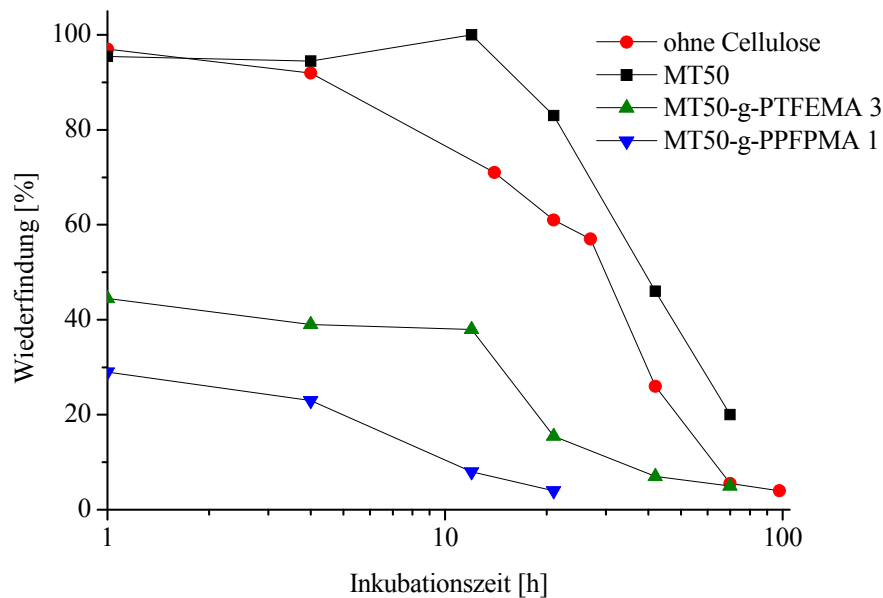
**Abb. 4-29:** Aggregation von Insulinlösungen bei erhöhter Temperatur (37°C; 1g l<sup>-1</sup> in HCl 10 mM).

Das durch polymeranaloge Umsetzung gewonnene Produkt HFP-MT50 1 hingegen zeigt zunächst keinerlei Adsorptionseffekte. Nach 1 h ist immer noch 100 % des Insulins nachweisbar. Insulin mit HFP-MT50 1 zeigt ein nahezu identisches Aggregationsverhalten wie die Insulinlösung mit unmodifizierter Perlcellulose. Der geringe Fluorgehalt scheint zumindest unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf das Experiment zu haben. Auf die Verwendung der noch schwächer modifizierten Perlcellulose HFP-MT50 2 wurde deshalb verzichtet.

Weitere Messreihen wurden bei Raumtemperatur von 22 °C unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Auf Grund der Temperaturniedrigung verringerte sich die Aggregationsgeschwindigkeit des Insulins deutlich: Liegt der  $t_{50\%}$ -Wert beim reinen Insulin bei 37 °C im Bereich von 6-7 h, so erhöht er sich nun auf ca. 30 h. Eine nahezu vollständige Aggregation – d.h. eine Wiederfindung < 10 % - wird erst nach 70 h erreicht. Erstaunlich ist, dass die native Perlcellulose MT50 eine Verzögerung der Aggregation bewirkt. Während die Inkubationszeit ohne Perlcellulose bei 4 h liegt, so erhöht sie sich mit MT 50 auf 12 h. Alle folgenden Proben weisen mit MT 50 zudem eine ca. 15 - 25 % höhere Wiederfindung auf. Um diesen Effekt genauer zu Untersuchen und um auszuschließen, dass es sich um einen Konzentrationseffekt auf Grund des Restwassers in der feuchten Perlcellulose handelt, wurden später noch zusätzliche Messreihen durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.1e).

Das fluorhaltige Pflöpfprodukt MT50-g-PTFEMA 3 zeigt auch bei niedrigen Temperaturen starke Adsorptionseffekte. Die Wiederfindung liegt mit 45 % geringfügig höher als bei 37 °C mit 41 %. Nimmt man diesen Wert als Startwert an, so liegt die Halbwertszeit der

Insulinaggregation unterhalb 20 h, was deutlich niedriger ist als die 30 h ohne Cellulose oder die 40 h mit nativer Cellulose. Das fluorierte Material scheint somit die Aggregation des Insulins – zumindest unter diesen Bedingungen – zu beschleunigen.



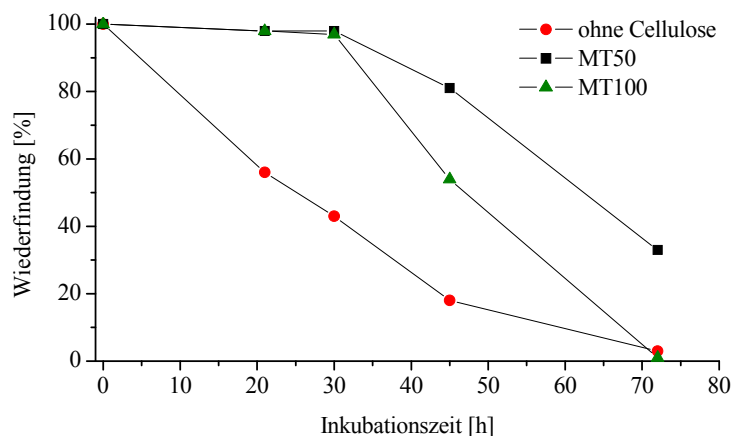
**Abb. 4-30:** Aggregation von Insulinlösungen bei Raumtemperatur (22°C; Insulinlösung 1 g l<sup>-1</sup> in HCl 10 mM).

Dieser Effekt zeigt sich noch stärker, wenn man die Messreihe für MT50-g-PPFPMA 1 betrachtet. Die Wiederfindung nach einer Stunde liegt bei nur 30 % der Ausgangskonzentration, was somit eine Verstärkung der Adsorption bedeutet. Auch der Wert für  $t_{50\%}$  (bezogen auf den ersten Messwert nach einer Stunde) verringert sich auf ca. 8 h was dem  $t_{50\%}$ -Wert für reines Insulin bei 37° C entspricht. Dieser Effekt kann durch die absolute aufgepfropfte Menge Fluor nicht erklärt werden. Beide Proben haben einen ähnlichen Fluorgehalt (Werte Fluor-Elementaranalyse: MT50-g-PTFEMA 3: 1.8 %; MT50-g-PPFPMA 1: 1.9%), auf Grund des höheren Fluorgehalts der Monomere ist die absolute Menge an aufgepfropftem Acrylat bei letzterem sogar niedriger. Es ist zu vermuten, dass durch Verwendung des Monomers mit fünf Fluoratomen stärker hydrophobe Bereiche mit einer deutlich höheren Fluordichte entstehen. Zudem deuten die Ergebnisse der XPS-Untersuchungen auf eine bevorzugte Modifizierung der Partikeloberfläche hin. Beides kann zu einer stärkeren Adsorption und einer beschleunigten Aggregation des Insulins führen.

e) *Einfluss der Porengröße von Perlcellulose auf das Aggregationsverhalten von Insulin*

Die vorhergehenden Messreihen haben gezeigt, dass durch Zusatz der nativen Perlcellulose MT50 zur Insulinlösung eine Verzögerung der Aggregation beobachtet werden kann. Dies sollte mit weiteren Experimenten genauer untersucht werden, wobei Perlcellulosen mit unterschiedlichen Porengrößen eingesetzt wurden. Neben der kleinporigen Perlcellulose MT50 mit einer mittleren Porengröße von 16 nm, wurde nun zusätzlich das Produkt MT100 verwendet. Der mittlere Porendurchmesser der Perlcellulose MT100 – bestimmt mit ISEC – liegt mit 45 nm im Bereich der Größe der Insulinaggregate (vgl. Abb. 4-26).

Da bei diesen beiden Proben das spezifische Porenvolumen stark variiert, wurden getrocknete Produkte eingesetzt. Dadurch kann vermieden werden, dass bei gleichen Mengen an eingesetzter Cellulose unterschiedliche Insulinkonzentrationen auftreten. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Aggregationsverzögerung nur um einen Konzentrationseffekt handelt. Neben der Perlcellulose MT50 wurde zusätzlich die großporige MT100 eingesetzt. Analog zu den vorhergehenden Experimenten wurde jeweils die gleiche Menge an Feststoff ( $33 \pm 0.15$  mg) eingewogen. Als Referenz wurde ebenfalls eine reine Insulinlösung ohne Gelzusatz aggregiert.



**Abb. 4-31:** Insulinaggregation bei pH 2. Die Einwaage der Gelmaterialien erfolgte in trockenem Zustand (Versuchsbedingungen: 22°C;  $c_{\text{Insulin}} 1 \text{ g l}^{-1}$  in HCl 10 mM)

Trotz der relativ großen Variation der Messergebnisse zeigen sich eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Messreihen: Befindet sich Perlcellulose in der Lösung ist nach 30 h keine Aggregation festzustellen. Die Probe mit der reinen Insulinlösung ist hingegen zu diesem Zeitpunkt schon zu 50 % aggregiert. Nach 72 h ist bei den Proben mit der großporigen

Cellulose bzw. mit der reinen Insulinlösung nahezu komplett aggregiert, bei der MT50 sind hier noch 33 % des Insulins nicht aggregiert.

Die Verzögerung der Aggregation im Falle der Anwesenheit der Perlcellulose MT50 kann mit einer idealen Porengröße des Gelmaterials erklärt werden. Diese ist mit ca. 16 nm groß genug, damit Insulinmonomere oder -dimere leicht eindiffundieren können. Befindet sich ein Insulinmonomer oder -dimer in einer Pore der Perlcellulose MT50, so ist es wenig wahrscheinlich, dass sich weitere Moleküle in derselben Pore befinden. Die Bildung von Protofibrillen wird somit weniger wahrscheinlich. Die Poren der Perlcellulose MT100 liegen mit 45 nm hingegen in der Größenordnung der mittels DLS bestimmten Insulinaggregate: Die Wahrscheinlichkeit, dass in die Poren diffundierte Insulin-Moleküle in Wechselwirkung miteinander treten ist dadurch im Vergleich zur Perlcellulose mit kleinen Poren erhöht, jedoch niedriger als im Vergleich zur Lösung ohne Perlcellulose. Es kann somit auch eine Verzögerung der Aggregation festgestellt werden. Diese ist jedoch deutlich geringer als im Fall von MT50.

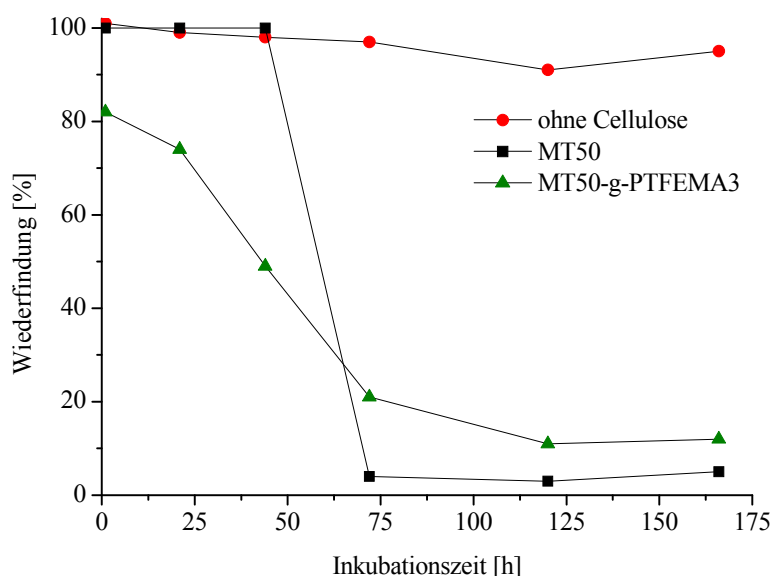
Der starke Einfluss der Porengröße ist daran zu erkennen, dass die Probe MT50 eine deutlich stärkere Verzögerung der Aggregation bewirkt als MT100, obwohl letztere ein ca. 2 ½-mal größeres Porenvolumen besitzt (es wurde jeweils dieselbe Masse an Cellulose eingewogen).

Wiederholungsmessungen deuten auf eine Variationen der jeweiligen Halbwertszeiten  $t_{50\%}$  zwischen einzelnen Messreihen hin. Diese sind vermutlich auf geringfügige Unterschiede zwischen den jeweils eingesetzten Insulinstammlösungen zurückzuführen. Statistische Abschätzungen waren im Rahmen dieser Arbeit aus Zeit- und Kostengründen leider nicht mehr möglich.

#### e) *Einfluss modifizierter Perlcellulose auf die Insulinaggregation bei pH 10*

Neben der Insulinaggregation in saurem Medium wurden zusätzlich Versuche bei schwach basischem pH durchgeführt. Auf Untersuchungen bei einem neutralen pH-Wert wurde verzichtet, da hier die Aggregationsneigung des Insulins am niedrigsten ist. Dies kann damit erklärt werden, dass der Anteil an Insulinhexamer bei pH 7 bei nahezu 100 % liegt, während bei pH 10 nur 8 % Dimer bzw. Tetramer und ca 1 % Monomer vorliegen [106]. Verglichen mit pH 2 ist der Anteil an stabilisiertem Hexamer jedoch immer noch sehr hoch, so dass eine relativ geringe Aggregationsneigung besteht. Als Puffersystem wurde ein Ammoniumpuffer mit einer Konzentration von 10 mM bei einem pH von 10 gewählt. Die Durchführung der Experimente verlief analog zu den vorhergehenden. Allerdings wurde die Insulinkonzentration der Stammlösung auf Grund der geringeren Löslichkeit bei pH 10 auf 0.5 g l<sup>-1</sup> verringert. Es

wurden – neben der reinen Insulinlösung – Mischungen mit MT50 und MT50-g-PTFEMA 3 untersucht.



**Abb. 4-32:** Insulinaggregation bei pH 10 (22 °C; Insulinlösung 0.5 g l<sup>-1</sup> in NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl 10 mM)

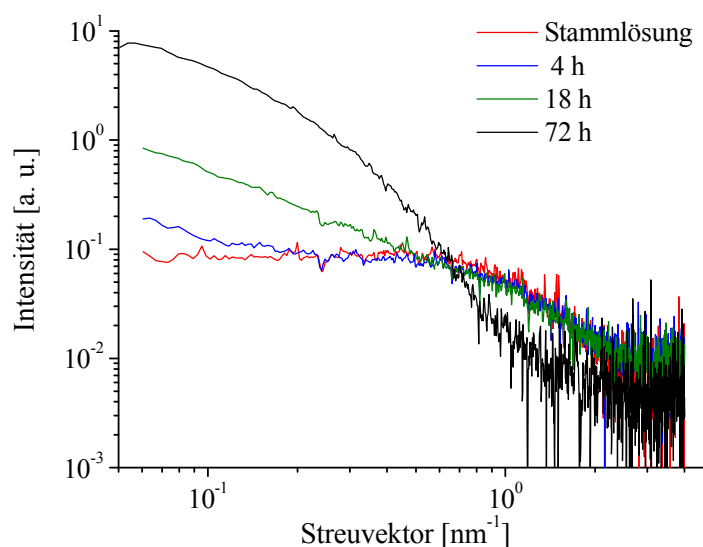
Im Gegensatz zu den Versuchen unter sauren Bedingungen zeigten die Proben mit der reinen Insulinlösung auch nach fast einer Woche noch keine nennenswerte Aggregation. In Gegenwart der fluorierten Perlcellulose verlief die Adsorption und Aggregation vergleichbar wie bei pH 2. Allerdings ist die Adsorption auf der modifizierten Perlcellulose zu Beginn der Messungen deutlich geringer (Wiederfindung von 82 % nach 1 h). Dies entspricht den Ergebnissen der Adsorptionsuntersuchungen von Proteinstandards in Abhängigkeit des pH-Wertes. Auch hier war die Adsorption in saurem Milieu weitaus stärker ausgeprägt als bei pH 10. Besonders überraschend sind die Ergebnisse für die reine Perlcellulose MT50: Es tritt zunächst ebenfalls eine Verzögerung der Aggregation auf, nach ca. 50 Stunden stellt man jedoch einen plötzlichen Abfall der Insulinkonzentration fest. Dieser deutet auf einen spontanen autokatalytischen Vorgang hin. Als Grund hierfür könnte das Vorliegen geladener Gruppen – d.h. vor allem Carboxylgruppen – bei pH 10 genannt werden. Dadurch wäre es möglich, dass die positiv geladenen Zink-Ionen an der Oberfläche adsorbiert und dadurch das Gleichgewicht vom Hexamer zum Monomer verschoben wird, was eine Beschleunigung der Aggregation bewirken würde. Sind erste Aggregate gebildet, würden diese als Kondensationskeime für eine weitere Aggregation dienen, so dass innerhalb einer relativ kurzen Zeit nahezu das gesamte Insulin aggregiert.

Die fluoridierte Perlcellulose zeigt zu Beginn nur eine schwache Adsorption. Im Gegensatz zu den Versuchen bei pH 2, wo nach 1 h nur noch 45 % (bei RT) der Anfangskonzentration

gefunden wurden, werden bei pH 10 immerhin noch 82 % wiedergefunden. Dies ist auf die anionische Gesamtladung des Insulins zurückzuführen, so dass die hydrophoben Wechselwirkungen durch repulsive Kräfte zwischen Insulin und anionischer Celluloseoberfläche zum Teil verhindert werden. Die Aggregationsgeschwindigkeit ist jedoch auch bei pH 10 für die fluorierten Materialien etwas höher. So ist nach ca. 50 h noch die Hälfte des Insulins nicht aggregiert bzw. adsorbiert (bezogen auf den Wert nach 1 h), während dieser Wert für die nicht fluorierten Perlen erst nach ca. 60 h erreicht wird. Auch unter diesen Bedingungen zeigt die Fluorierung der Oberfläche somit keine verzögernde Wirkung auf die Aggregation.

#### 4.4.3 Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) an aggregierten Insulinproben

Mit Hilfe der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Messungen konnte die Aggregation von Insulin hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gut verfolgt werden. Allerdings erfolgte eine Quantifizierung der Insulinaggregate nur indirekt über eine Bestimmung der nicht-aggregierten Insulin-Anteile.



**Abb. 4-33:** SAXS-Messungen an Insulinlösungen ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ; pH 2.0) mit MT50-g-PTFEMA 3. Die Stammlösung wurde zusammen mit modifizierter fluormodifizierter Perlcellulose inkubiert und anschließend filtriert ( $1.2 \mu\text{m}$  Acrodisc Filter). Zum Vergleich: Nicht geschüttelte Insulin Stammlösung.

Um nun das Aggregationsverhalten des Insulins in Gegenwart von Perlcellulose direkt verfolgen zu können und somit Informationen hinsichtlich der Form und Größe der gebildeten Strukturen zu erhalten, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Die gebildeten Insulinaggregate wurden in situ mit Hilfe der SAXS und der DLS untersucht. Hierzu wurden erneut Insulinlösungen bei Raumtemperatur zusammen mit (modifizierten) Cellulosepartikeln wie

zuvor beschrieben geschüttelt. Da für die SAXS-Messungen um gute Ergebnisse zu erhalten nach Möglichkeit höhere Konzentrationen eingesetzt werden sollten, wurde eine Insulin-Stammlösung mit einer Konzentration von  $10.0 \text{ g l}^{-1}$  bei pH 2 eingesetzt. Zur Abtrennung der Perlcellulose wurden Filter mit einer Porengröße von  $1.2 \text{ }\mu\text{m}$  verwendet. Dadurch wird gewährleistet, dass zum Einen eventuell entstandene Insulinaggregate nicht abgetrennt werden und andererseits keine Cellulosepartikel mehr in der Lösung vorhanden sind. Da mit SAXS nur Strukturen bis zu einer Obergrenze von ca.  $100 \text{ nm}$  erfasst werden, ist somit keine signifikante Beeinflussung der Ergebnisse zu erwarten. Neben der reinen Stammlösung wurde jeweils Mischungen mit unmodifizierter Perlcellulose MT50, der gepfropften Perlcellulose MT50-g-PTFEMA 3 sowie der polymeranalog modifizierten Cellulose HFP-MT50 1 verwendet. Diese wurden jeweils 4, 18 und 72 h geschüttelt.

**Tab. 4-14:** Ergebnisse der SAXS-Messungen an Insulinproben nach 4, 18 und 72 h. Konzentration je  $10 \text{ g l}^{-1}$ . Kurven wurden je mit Kugel- bzw. Zylindermodellen angepasst. Berechnung der aggregierten bzw. nicht-aggregierten Massenanteile  $w$  aus den Scaling-Parametern (bei gemischtem Modell).  $r_K$ : Radius Kugel;  $r_Z$ : Radius Zylinder;  $l_Z$ : Länge Zylinder.

Probe	Dauer [h]	$r_K$ [nm]	$r_Z$ [nm]	$l_Z$ [nm]	$w_{\text{nicht aggregiert}}$ [%]	$w_{\text{aggregiert}}$ [%]
Stammlösung	0	1.67	--	--	100	0
Ohne Cellulose	4	1.60	--	--	100	0
+ MT50	4	1.65	--	--	100	0
+ MT50-g-PTFEMA 3	4	1.80	1.8	>100	<b>10</b>	<b>90</b>
+ HFP-MT50 1	4	1.65	--	--	100	0
Ohne Cellulose	18	1.60	2.1	>100	<b>86</b>	<b>14</b>
+ MT50	18	1.65	--	--	100	0
+ MT50-g-PTFEMA 3	18	--	1.4	>100	0	<b>100</b>
+ HFP-MT50 1	18	1.77	--	--	100	0
Ohne Cellulose	72	--	4.9	>100	0	100
+ MT50	72	--	4.6	>100	0	100
+ MT50-g-PTFEMA 3	72	--	4.9	>100	0	100
+ HFP-MT50 1	72	--	5.8	>100	0	100

Die Streuintensität als Funktion des Streuvektors wurde mit Hilfe eines SAXSess-Systems über eine Absolutmessung bestimmt, d.h. normiert auf die Primärstrahlintensität. Alle Messungen erfolgten mit einer Durchflusskapillare. Die Proben wurden direkt nach den SAXS-Messungen zusätzlich mit der DLS untersucht.

Für die Insulin Stammlösung wurde durch Anpassung der Streukurve mit einem Kugelmodell ein Radius  $r$  von  $1.6 \text{ nm}$  bestimmt und entsprechend der Formel  $r_g^2 = (3/5) r^2$  ein

Gyrationsradius  $r_g$  von 1.28 nm bestimmt wurde. Mit Hilfe der DLS wurde ein hydrodynamischer Radius von 1.34 nm bestimmt<sup>-a-</sup>. Diese Werte stimmen sehr gut mit Literaturwerten überein: *Nielsen* et al. bestimmte mittels SAXS einen Gyrationsradius  $r_g$  von 1.16 nm für das Insulin-Monomer, die Werte für das Dimer sind 1.49 nm, 1.78 nm für das Tetramer sowie 1.98 für das Hexamer [107]. Nach *Uversky* et al. liegt  $r_g$  im neutralen Medium (pH 7) bei  $1.20 \pm 0.05$  nm für das Monomer und bei  $2.45 \pm 0.05$  nm für das Hexamer, während in saurer Lösung bei pH 2 der  $r_g$  des Monomers bei  $1.14 \pm 0.06$  nm liegt [108]. Die vorliegende Stammlösung scheint somit aus einer Mischung von Monomeren und Dimeren zu bestehen.

Nach einer Inkubationszeit von 4 h zeigte nur die Probe mit MT50-g-PTFEMA 3 eine Aggregation. Die Streukurve wurde mit einer Mischung aus Kugel- und Zylindermodell angepasst. Dabei wurde ein Kugelradius  $r_K$  von 1.8 nm erhalten, der Zylinderradius  $r_Z$  beträgt 1.8 nm. Aussagen über die Zylinderlänge können mit SAXS nur insofern getroffen werden, als dass die Aggregate größer als 100 nm sind. Dies entspricht dem oberen Bereich der mit SAXS erfasst wird. Für die Kurvenanpassungen wurde jeweils eine Länge von 500 nm angenommen. Die Massenanteile des aggregierten zum nicht-aggregierten Insulins wurden aus den Skalierungsfaktoren bestimmt ( $w_{\text{aggregiert}} = \text{Scale}_{\text{Kugel}} / (\text{Scale}_{\text{Kugel}} + \text{Scale}_{\text{Zylinder}})$  bzw.  $w_{\text{nicht-aggregiert}} = \text{Scale}_{\text{Zylinder}} / (\text{Scale}_{\text{Kugel}} + \text{Scale}_{\text{Zylinder}})$ ). Es zeigte sich, dass nach 4 h bereits 90 % des Insulins aggregiert waren. Die Referenzproben ohne Cellulose, sowie mit MT50 und HFP-MT50 1 zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Aggregationseffekte, die berechneten Radien des Insulins waren mit denen der Stammlösung zu Beginn des Experiments vergleichbar.

Nach 18 h zeigen die Proben mit der unmodifizierten Perlcellulose MT50 sowie mit der modifizierten HFP-MT50 1 ebenfalls noch keine Aggregation des Insulins. Die Probe mit MT50-g-PTFEMA 3 ist nach 18 h hingegen stark aggregiert, es konnte kein niedermolekulares Insulin mehr bestimmt werden. Die Dimensionen der Aggregate wurden durch Anpassung mit einem Zylindermodell bestimmt. Hier wurde ein Radius von 1.4 nm erhalten. Bei der Referenzprobe ohne Cellulose konnte niedermolekulares und aggregiertes Insulin nebeneinander nachgewiesen werden, wobei der Anteil des nicht-aggregierten Insulins mit 86 % überwiegt.

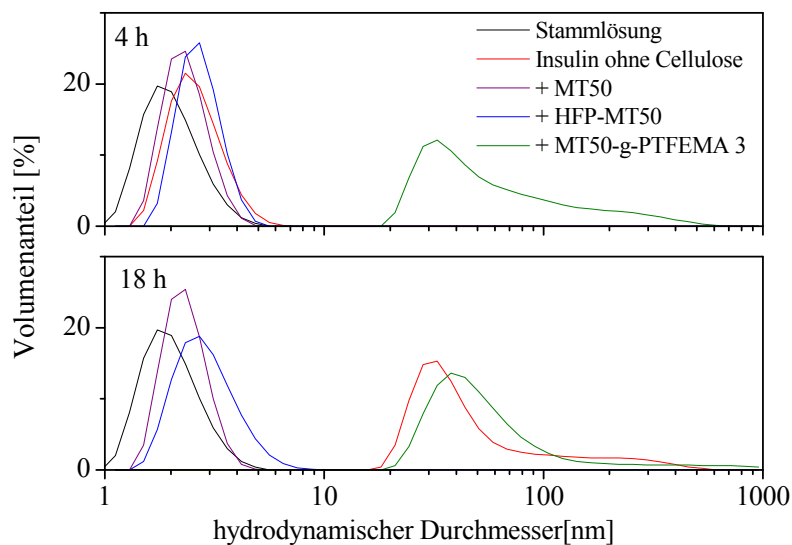
Die SAXS-Messungen nach 72 h zeigen für alle Proben eine starke Aggregation. Da die Zylinderlänge auch hier den Bereich der SAXS überschreitet sind Unterschiede somit nur im Radius zu erkennen. Diese sind jedoch relativ gering, der kleinste Wert wird mit MT50 bestimmt (4.6 nm), der größte mit HFP-MT50 1 (5.8). Allerdings ist anzunehmen, dass ein

<sup>-a-</sup> Die Insulin Probe ( $10 \text{ g l}^{-1}$  in pH) wurde für die DLS Messung zweimal mit  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  GHP Filtern filtriert. Die bestimmung des Radius erfolgte aus der Intensitätsverteilung.



reines Zylindermodell die realen Aggregate nicht im Detail beschreiben kann. Vielmehr ist zu vermuten, dass es sich bei den stark aggregierten Insulinproben um fadenförmige Partikel handelt, die wiederum ein komplexes Netzwerk bilden.

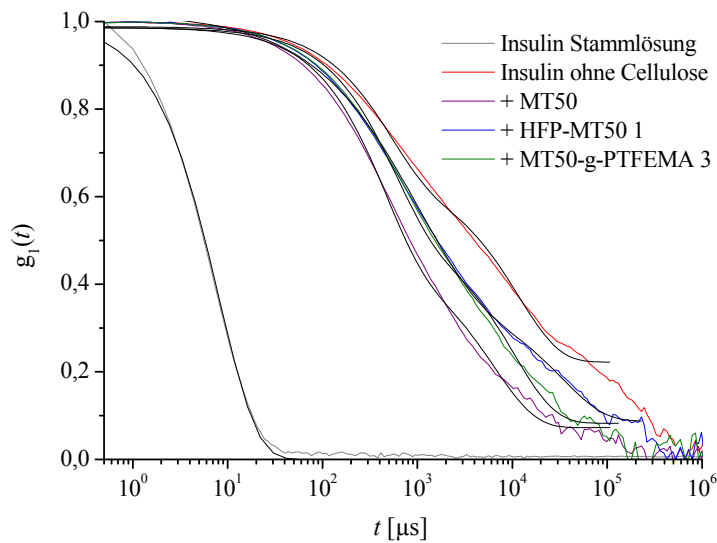
Um weitere Informationen über die Größe bzw. Länge der Fibrillen zu erhalten wurden die inkubierten und filtrierten Lösungen zusätzlich mittels DLS gemessen. Die so erhaltenen Volumenverteilungen der Partikeldurchmesser  $D_V$  nach 4 und 18 h sind in Abb. 4-34 dargestellt. Die Insulin-Stammlösung wurde ohne schütteln inkubiert ( $D_V = 2.1$  nm). Die reine Insulinlösung zeigte nach 4 Stunden noch keine Anzeichen von Aggregation ( $D_V = 2.6$  nm), nach 18 h sind Aggregate bereits deutlich zu erkennen ( $D_V = 68$  nm). Die stärkste Aggregation wurde mit MT50-g-PTFEMA 3 festgestellt (4 h: 81 nm; 18 h: 118 nm), während die Proben mit unmodifizierter MT50 weder nach 4 h noch nach 18 h Anzeichen von Aggregation aufweisen (4 h: 2.4 nm; 18 h: 2.4 nm). Dasselbe gilt für die Proben mit schwach modifizierter HFP-MT50, die gemessenen Durchmesser liegen jedoch etwas über den unmodifizierten Proben (4 h: 2.7 nm; 18 h: 3.0 nm).



**Abb. 4-34:** DLS-Untersuchung zur der Aggregation von Mischungen aus Insulin mit (modifizierten) Cellulosepartikeln. Proben wurden 4 (oben) bzw. 18 h (unten) geschüttelt. Als Referenz ist die (nicht geschüttelte) Insulin-Stammlösung ( $c = 10 \text{ g l}^{-1}$  mit pH 2) mit angegeben.

Für die Proben mit einer Schütteldauer von 72 h zeigte sich, dass die Auswertung mit der DLS Software (Dispersion Technology Software 5.02 von Malvern Instruments Ltd.) nur unbefriedigende Ergebnisse lieferte. Hierzu wurden die Korrelationsdaten normiert und mit zwei monomodalen Exponentialfunktionen angepasst (Abb. 4-35). Aus den erhaltenen Diffusionskoeffizienten konnte anschließend die Partikelgrößen berechnet werden (genaue Methodenbeschreibung im Experimentellen Teil; 6.6.9). Problem bei allen gemessenen Kurven

nach 72 h ist, dass  $g^1(t)$  für Korrelationszeiten größer  $10^5$  einen stufenweisen Abfall aufweist. Dadurch ist eine gute Kurvenanpassung nicht möglich. Dies wird vor allem bei der Insulin-Probe ohne Cellulose deutlich: Während die Autokorrelationsfunktion darauf hindeutet, dass hier die größten Aggregate der Messreihe vorliegen (d.h. die Kurve ist zu höheren Korrelationszeiten verschoben), werden trotzdem mit der bimodalen Kurvenanpassung die zweitniedrigsten Werte berechnet. Dies kann mit dem Umstand erklärt werden, dass die Kurvenanpassung für diese Probe bei einem Ordinaten-Wert von 0.22 endet, während bei den drei anderen Proben Werte bis in den Bereich von 0.08 angepasst werden. Besonders hochmolekulare Anteile werden so nicht mehr erfasst und es werden dadurch zu niedrige Radien bestimmt. Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich eine vereinfachte Auswertung, wobei jeweils nur eine monodispersen Exponentialfunktion bis zu einer Exponentialfunktion von  $1000 \mu\text{s}$  angepasst wurde. Die Gesamtheit einer Probe wird dadurch zwar nicht komplett erfasst, die einzelnen Proben können so jedoch besser miteinander verglichen werden.



**Abb. 4-35:** Autokorrelationsfunktion  $g^1(t)$  für Insulinproben nach 72 h. Proben wurden zusammen mit (modifizierten) Cellulosepartikeln geschüttelt (pH 2;  $10 \text{ g l}^{-1}$ ). Die Anpassung erfolgte jeweils mit zwei monodispersen Exponentialfunktionen ( $g^1(t) = a_1 \exp(-t/t_1) + a_2 \exp(-t/t_2)$ ). Die Messung der Insulin Stammlösung wurde mit nur einer Exponentialfunktion angepasst.

Die stärkste Aggregation nach 72 h zeigte die Insulin-Probe ohne Cellulose, während für beide Proben mit modifizierter Cellulose ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Die kleinsten Aggregate werden erneut mit der unmodifizierten Cellulose MT50 erhalten. Mit den beiden fluorierten Proben werden ähnliche Ergebnisse erzielt. Mit einem monodispersen Anpassung werden nahezu identische Werte erhalten (Abweichung  $< 2 \%$ ), mit einer bimodalen

Anpassung werden insbesondere für die hochmolekularen Anteile (d.h. für  $r_{S2}$ ) der Probe HFP-MT50 1 größere Werte gefunden.

Es ist darauf hinzuweisen, dass sich die Stokes-Einstein-Beziehung ausdrücklich auf kugelförmige Partikel bezieht. Trifft dies für monomeres oder hexameres Insulin noch relativ gut zu, so werden höhermolekulare Insulinaggregate dadurch nur mangelhaft beschrieben. Die hydrodynamischen Durchmesser der DLS sind somit nur grobe Anhaltspunkte für die tatsächlichen Größenverhältnisse. Genauere Ergebnisse können durch eine Kombination von SAXS und DLS-Daten erhalten werden. Mit Hilfe der SAXS wurden bereits die Radien der entstehenden Fibrillen bestimmt, mit der DLS kann nun die Länge abgeschätzt werden [109]. Der Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient  $D$  und Reibungskoeffizient  $C$  ist gegeben durch

**Gl. 4-7:** 
$$D = \frac{k_B T}{C}$$

wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur darstellt. Für stabförmige Partikel mit einer Länge  $l$  und einem Radius  $r$  ist der Reibungskoeffizient gegeben als

**Gl. 4-8:** 
$$C = \frac{3\pi\eta l}{\ln(l/2r) + \gamma}$$

wobei  $\eta$  die dynamische Viskosität und  $\gamma$  eine Funktion von  $l$  und  $r$  ist. Für den Bereich  $1 < l/r < 10$  gilt nun

**Gl. 4-9:** 
$$\gamma = 0.312 + 1.122 \frac{r}{l} + 0.4 \left( \frac{r}{l} \right)^2$$

Allerdings ist das Verhältnis  $l/r$  für Insulin-Fibrillen in der Regel deutlich höher, die Längen sind somit nur als Schätzwerte anzusehen. Zur Berechnung wurde die dynamische Viskosität von Wasser mit 0.887 mPa s bei einer Temperatur von 298 K benutzt. Der Diffusionskoeffizient wurde jeweils – wie weiter oben beschrieben – aus der Autokorrelationsfunktion  $g^1(t)$  bestimmt.

Für die Probe mit MT50-g-PTFEMA 3 wurde nach 4 h eine Länge von 960 nm und nach 18 h 780 nm bestimmt (entspricht  $D = 3.06 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $3.79 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Für die cellulosefreie Probe nach 18 h beträgt die Länge 930 nm ( $D = 3.06 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Für die stark aggregierten Proben nach 72 h Inkubationszeit wurden die Diffusionskoeffizienten sowohl mit einer einfachen gestreckten Exponentialfunktion  $D$  sowie mit einer bimodalen Exponentialfunktion berechnet ( $D_1$  und  $D_2$ ). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 4-15 angegeben. Hier zeigt sich, dass die Ergebnisse für  $l_Z$  unrealistisch hoch sind. Da die Proben mit einem 1.2  $\mu\text{m}$  Filter behandelt worden sind, sind Zylinderlängen von 3  $\mu\text{m}$  und mehr unwahrscheinlich. Noch größere Werte werden für  $l_{Z2}$  bestimmt (mit 18-51  $\mu\text{m}$ ). Vermutlich werden hier in erster Linie

komplexe Netzwerke die aus kleineren Fibrillen aufgebaut sind erfasst. Solche Strukturen können jedoch mit der Gl. 4-8 in keinsten Weise beschrieben werden. Mit dem ersten Glied der bimodalen Exponentialfunktion werden hingegen realistische Werte erhalten. Die Fibrillenlänge  $l_{Z1}$  liegt im Bereich von 700 und 1000 nm und somit im selben Größenbereich wie die deutlich schwächer aggregierten Proben nach 4 h bzw. 18 h.

**Tab. 4-15:** DLS-Messungen an aggregierten Insulinproben nach 72 stündiger Inkubation (RT, pH 2, 10 g l<sup>-1</sup>). Kurvenanpassung der Autokorrelationsfunktionen  $g^1(t)$  erfolgte mit mono- und bimodalen Exponentialfunktionen.  $D$ : Diffusionskoeffizient;  $r_s$ : Stokes-Radius;  $l_z$ : Länge der Fibrillen (Kombination SAXS und DLS; Berechnung nach [109]).

	$D$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$r_s$ [nm]	$l_z$ [nm]	$D_1$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$r_{s1}$ [nm]	$l_{z1}$ [nm]	$D_2$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$r_{s2}$ [nm]	$l_{z2}$ [nm]
Stammlösung <sup>-a-</sup>	1.77 10 <sup>-10</sup>	1.39	--	--	--	--	--	--	--
Ohne Cellulose	4.13 10 <sup>-13</sup>	596	8540	2.94 10 <sup>-12</sup>	83.8	<b>800</b>	1.26 10 <sup>-13</sup>	1980	33500
MT50	1.08 10 <sup>-12</sup>	228	3000	3.33 10 <sup>-12</sup>	74.0	<b>695</b>	2.22 10 <sup>-13</sup>	1110	17650
MT50-g-PTFEMA 3	6.91 10 <sup>-13</sup>	356	5080	2.62 10 <sup>-12</sup>	93.8	<b>925</b>	1.38 10 <sup>-13</sup>	1780	30000
HFP-MT50 1	6.78 10 <sup>-13</sup>	363	5200	2.30 10 <sup>-12</sup>	107.1	<b>1045</b>	8.45 10 <sup>-14</sup>	2910	51300

<sup>-a-</sup> nicht geschüttelt

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit den SAXS- und DLS-Messungen an konzentrierten Insulin-Proben ( $c = 10 \text{ g l}^{-1}$ ) die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente mit niedrigkonzentrierten Insulinlösungen (Kap. 4.4.2) vollauf bestätigt werden: Die gepfropfte Perlcellulose MT50-g-PTFEMA 3 beschleunigt die Aggregation von Insulin deutlich, schon nach 4 h sind 90 % der Probe aggregiert. Die nichtmodifizierte Cellulose MT50 verzögert auch hier die Aggregation, nach 18 h sind noch keine Aggregate nachweisbar. Nach 72 h sind jedoch alle vier Proben aggregiert. Doch auch hier werden mit MT50 kleinere Aggregate gefunden. Zusätzlich können Aussagen hinsichtlich des Ablaufs der Aggregation getroffen werden: Zunächst liegt das Insulin in erster Linie als Monomer- bzw Dimer vor. Tritt Aggregation ein, so bilden sich schnell Strukturen mit Längen im Bereich von 700 bis 1000 nm, sowie Radien zwischen 1.4 und 2.1 nm. Nach weiterer Inkubationszeit bleibt die Fibrillenlänge zunächst mehr oder weniger gleich lang. Allerdings nimmt der Radius dann deutlich zu (~5 nm). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich einzelne Fibrillen parallel zusammenlagern und so größere Fibrillenstrukturen bilden. Schließlich kommt es zu einer kompletten Aggregation, wobei sich vermutlich komplexe Netzwerke bzw. Hydrogelstrukturen bilden [110]. Solche Strukturen lassen sich mit einem Kugel- bzw. Zylindermodell nur noch mangelhaft beschreiben.

## 5 Zusammenfassung

Die chromatographische (Auf-)Trennung von Peptiden und Proteinen ist bereits heute ein vielfach bearbeitetes Gebiet, da diese Methode sowohl für die Produktanalytik als auch großtechnisch als Downstream-Prozess in biotechnologischen und pharmazeutischen Produktionen eingesetzt wird.

Die meisten Verfahren der flüssigen Hochleistungschromatographie nutzen dabei Wechselwirkungen zwischen der Trennphase und dem Analyten als Trennprinzip. Dagegen sind für eine wechselwirkungsfreie Trennung von Proteinen nach ihrer Größe (*Size Exclusion Chromatography*, SEC), neue effiziente, d.h. im Besonderen druckstabile, poröse Trägermaterialien erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden kommerzielle Perlcellulosen als SEC-Phasen zur Auftrennung von Proteinen wie etwa Insulin untersucht. Die Partikelgröße und Oberflächenstruktur verschiedener Perlcellulosen konnte mit Hilfe der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie bestimmt werden, die Analyse der Porenstruktur erfolgte mittels He-Pyknometrie, Hg-Porosimetrie, Gasadsorptionsmessungen und SAXS an getrockneten Cellulosepartikeln. Die SAXS-Messungen wurden vergleichend in wässrigen Medien durchgeführt und durch Untersuchungen der inversen Größenausschlusschromatographie (ISEC) ergänzt.

Bei der Hg-Porosimetrie zeigte sich, dass hiermit kleinere Poren ( $D < 4$  nm) nicht detektiert werden. Zudem wird das Cellulosematerial unter dem hohen Messdruck aufgeweitet, so dass stets zu große Porendurchmesser ermittelt werden. Die Messergebnisse belegen jedoch die gute mechanische Stabilität des Trägermaterials, eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz als Trennphase in der Hochleistungschromatographie. Durch SAXS-Messungen wird das gesamte Porensystem der Celluloseperlen erfasst, inklusive der geschlossenen Poren, die keinen Einfluss auf das Trennverhalten der Trägerphase besitzen. Mit Hilfe der SAXS-Methode wurden sowohl in Wasser gequollene als auch getrocknete Proben untersucht. Trotz schonender Trocknung (sequenzieller Lösemittelaustausch) war eine Schrumpfung der Poren zu beobachten. Daher resultieren auch Unterschiede aus den Messungen der N<sub>2</sub>-Sorption und der ISEC. Aus der ISEC wurden die (mittleren) Porengrößen der Perlcellulosen unter Bedingungen der wässrigen Flüssigkeitschromatographie erhalten, durch die Gasadsorptionsmessungen wurden zusätzliche Informationen über die Porengrößenverteilung und Porenbeschaffenheit der eingesetzten Cellulosesubstrate erhalten (z.B. das Vorhandensein von *Tintenfassporen*).

Erste chromatographische Untersuchungen mit Perlcellulosen belegen für Analytgemische aus Proteinen unterschiedlicher Struktur und Molmasse gute Trenneffekte in neutralen, wässrigen Pufferlösungen. Hierbei lassen sich keine signifikanten Wechselwirkungen von Trennphase und Analyt nachweisen, Perlcellulosen sind demzufolge für Anwendungen als SEC-Trennphase in wässrigen Medien prinzipiell geeignet.

Am Beispiel von Insulin konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Trifluorethanol die Proteinaggregation in wässrigen Medien verzögert werden kann. Neben dem Einsatz in der SEC könnten deshalb fluorhaltige Perlcellulosen durch Einstellung einer geeigneten Hydrophilie-Hydrophobie-Balance der Partikeloberfläche die Bildung unerwünschter Proteinaggregate bzw. -assoziate hemmen. Hierzu erfolgte eine Funktionalisierung der Celluloseoberfläche mittels reaktiver Fluorverbindungen – zum Einen durch radikalische Pfcopolymerisation von fluorierten Monomeren, zum anderen durch polymeranaloge Umsetzung. Durch die beiden Methoden konnte eine variable Verteilung der fluorhaltigen Gruppen auf der Partikeloberfläche gewährleistet werden. Die anschließende Partikelcharakterisierung erfolgte dann analog den unmodifizierten Partikeln. Insbesondere mit der ISEC konnte gezeigt werden, dass durch die Modifikationen das Porensystem der Cellulosepartikel nicht beeinflusst wurde. Zur chemischen Charakterisierung der modifizierten Partikel wurden IR-Spektroskopie, XPS sowie eine Fluor-Elementaranalyse eingesetzt. Die Menge an insgesamt eingeführtem Fluor liegt bei 1.8 - 2 % (bezogen auf die Gesamtmasse) im Falle der gepfropften Perlcellulose, sowie im Bereich von 0.4 - 1.4 % bei den polymeranalog modifizierten Produkten.

Die modifizierten Cellulosephasen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit Protein-Standardmaterialien (pI jeweils ~5) unter SEC-Bedingungen getestet. Dabei erfolgte eine Variation von pH-Wert und Salzgehalt des Eluenten. Die fluorhaltigen Pfcopolymere zeigten hier eine deutlich erhöhte Adsorptionsneigung. Im Bereich des isoelektrischen Punktes (d.h. bei pH 5) erfolgte bei allen Proteinstandards eine nahezu komplette Adsorption auf der Oberfläche, während bei höherem pH-Wert – aufgrund repulsiver Kräfte zwischen negativ geladenen Proteinen und der Celluloseoberfläche – deutlich höhere Wiederfindungen detektiert wurden. Das Adsorptions- bzw. Desorptionsvermögen für Proteine kann durch physikalisch-chemische Stimuli somit gezielt gesteuert werden. Allerdings konnten Wechselwirkungen mit einzelnen Proteinen in keinem Fall komplett unterdrückt werden. Insbesondere Insulin zeigt eine erhöhte Adsorptionsneigung auf den gepfropften Partikeln. Die Untersuchungen deuten zudem darauf

hin, dass geringe Anteile anionischer Carboxylgruppen auf der Celluloseoberfläche vorhanden sind.

Ein Ziel der Arbeit war es Antworten auf die Frage zu finden, welchen Einfluss Cellulosepartikel mit kovalent auf der Oberfläche fixierten Fluorgruppen auf die Aggregation bzw. Fehlfaltung von Proteinen – und hier insbesondere Insulin – ausüben. Zu diesem Zweck wurde durch die kontrollierte Inkubation von Insulinlösungen mit Cellulosepartikeln gezielt eine Aggregation ausgelöst. Reine Insulinlösungen (d. h. ohne Cellulose) sind unter den gegebenen Bedingungen (pH 2; 37 °C; 1 g l<sup>-1</sup>) bereits nach ca. 7 h zu 50 % aggregiert, bei Raumtemperatur erhöht sich dieser Zeitraum auf ca. 30 h. Wird Insulin nun mit gefropfter Cellulose (d. h. mit CF<sub>3</sub>-Gruppen) geschüttelt, so aggregiert es schneller als Referenzproben ohne Cellulose. Vor allem jedoch erfolgt eine erhebliche Adsorption auf der Partikeloberfläche. Enthält die gefropfte Cellulose C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>- statt CF<sub>3</sub>-Gruppen (bei vergleichbarem Fluorgehalt) so bewirkt dies eine noch stärkere Adsorption und Aggregation des Insulins. Die polymeranalogmodifizierte Probe zeigte, trotz eines nur geringfügig kleineren Fluorgehalts im Vergleich zu gefropften Proben, keine signifikanten Unterschiede im Verhalten gegenüber unmodifizierter Perlcellulose. Die gleichmäßigere Verteilung des Fluors sorgt somit für eine starke Reduzierung der hydrophoben Wechselwirkung. Allerdings sind mit diesen Partikeln auch keinerlei Unterschiede in Bezug auf das Aggregationsverhalten des Insulins festzustellen. Im Gegensatz dazu führen unmodifizierte Perlcellulosen bei Raumtemperatur zu einer Verzögerung der Aggregation. Messungen mit Partikeln unterschiedlicher Porosität lassen auf eine Abhängigkeit der Aggregationsverzögerung von der Porengröße schließen. Der stärkste Effekt wird mit der Cellulose beobachtet, deren Porengrößen im Bereich von monomerem und hexamerem Insulin liegen und somit deutlich kleiner als die entstehenden Insulinaggregate sind. Bei deutlich größeren Poren ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Mit Hilfe von SAXS- und DLS-Untersuchungen an höher konzentrierten Insulinlösungen konnte gezeigt werden, dass bereits kurz nach dem Einsetzen der Aggregation Fibrillen von bis zu 1 µm Länge entstehen. Dieser Wert bleibt mit zunehmendem Fortschritt der Aggregation nahezu konstant. Allerdings nimmt mit der Zeit der Fibrillendurchmesser deutlich zu. Dies ist durch die Bildung von Protofibrillen zu erklären, die sich anschließend zu größeren Fibrillen parallel zusammenlagern. Im weiteren Verlauf der Aggregation bilden sich aus diesen Fibrillen komplexe Netzwerke. Fluorierte Pfcopopolymere führen auch bei erhöhten Insulinkonzentrationen zu einer beschleunigten Aggregation. Umgekehrt zeigten erneut die Mischungen mit unmodifizierter Perlcellulose die geringste Aggregationsneigung, so dass kleinere Strukturen gebildet wurden.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 *Materialien*

Die eingesetzten Perlcellulosen Perloza MT50 und MT100 stammen von der Firma Iontosorb (Usti nad Labem; Tschechien). Die Produkte wurden in gequollenem Zustand geliefert und sind zur Konservierung mit Natriumazid versetzt.

Das Rinderinsulin stammt von Sigma Aldrich ( $5733.5 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\geq 27 \text{ IU}$ , weißes Pulver). Die Protein-Kalibrations-Kits stammen von der Fa. GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien), das Pullulan-Kalibrations-Kit von der Fa. Polymer Standards Service (PSS; Mainz). Alle weiteren Chemikalien wurden in analytischer Reinheit verwendet.

### 6.2 *Trocknung der Perlcellulose*

Sollen die Poren möglichst vollständig erhalten bleiben, kann eine Trocknung nur über *Lösungsmittelaustausch* erfolgen. Die am häufigsten verwendete Lösungsmittelkombination ist 1. Wasser, 2. Alkohol (Methanol, Ethanol etc.) 3. Diethylether. Ausgezeichnete Ergebnisse werden nach Stamberg [31] auch mit der Kombination Wasser / DMSO / Diethylether erzielt. Zunächst wurde die Perlcellulose mit Wasser gewaschen. Hierzu wurden 50 g der feuchten Cellulose (Feststoffgehalt ca. 33 %) in 500 ml dest. Wasser suspendiert. Nach einigen Minuten war die Perlcellulose sedimentiert und der Überstand konnte vorsichtig abdekantiert werden. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Cellulose mit 500 ml 25 %iger Ethanol-Lösung suspendiert und einige Stunden stehen gelassen. Der Überstand wurde abgegossen und der Vorgang mit 50 %, 75 %, 96 % sowie absolutem Ethanol wiederholt. Anschließend wurde von Ethanol auf Diethylether in gleicher Weise umgespült (Mischverhältnisse Ethanol/Ether 25, 50, 75 und 100 %). Nachdem die Celluloseperlen in reinem Ether vorlagen, wurden diese abgenutscht und über Nacht im Abzug bei Raumtemperatur in einer Kristallisierschale getrocknet. Anschließend erfolgt eine weitere Trocknung im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C.

Zusätzlich erfolgte eine Trocknung der Perlcellulosen mittels einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Beta 2-16 der Martin Christ GmbH (Osterode am Harz).



### 6.3 Herstellung der Pufferlösungen

Die verwendeten Pufferlösungen wurden vor Gebrauch jeweils über eine 0.45 µm Membran (Cellulosetriacetat, Fa. Schleicher & Schuell) filtriert. Dadurch wurden die Lösungen gleichzeitig entgast. Als Lösungsmittel wurde jeweils Reinstwasser verwendet (Wasseraufbereitungssystem Elix<sup>®</sup> 5 + Milli-Q<sup>®</sup> Plus von Millipore; Leitfähigkeit < 0.2 µS cm<sup>-1</sup>). Die fertigen Puffer wurden noch einmal mit einer pH-Elektrode überprüft. Gegebenenfalls erfolgte zur Feinjustierung des pH-Werts eine Korrektur mit einigen Tropfen 1.0 bzw. 0.1 molarer HCl- oder NaOH-Lösung.

#### a) Phosphat Puffer

16.363 g NaCl (0.24 mol), 2.3996 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mmol) und 20 mg NaN<sub>3</sub> wurden in ein großes Becherglas eingewogen. Diese wurde bis ca. 1.9 l mit Reinstwasser aufgefüllt und gerührt bis sich alles gelöst hatte. Durch Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert auf den gewünschten Wert eingestellt. Für pH 7.5 waren ca. 16 ml nötig. Anschließend wurde die Lösung in einen 2 l Maßkolben überführt und aufgefüllt.

#### b) Zitronensäure-Phosphat-Puffer (nach McIlloaine [111])

Zunächst wurden Stammlösungen mit 0.1 M Citronensäure (Lösung A) und 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lösung B) hergestellt. Um den gewünschten pH-Wert zu erhalten, wurden diese entsprechend den in Tab. 6-1 angegebenen Mischungsverhältnissen gemischt. Anschließend wurden zu je 100 ml Pufferlösung 0.02 mol NaNO<sub>3</sub> sowie 1 mg NaN<sub>3</sub> zugegeben.

**Tab. 6-1:** Mischungsverhältnisse der Stammlösungen für Zitronensäure-Phosphat-Puffer (v/v)

pH	Lösung A [%]	Lösung B [%]
5	51.50	48.50
6	63.15	36.85
7	77.75	22.25
8	97.25	2.75

#### c) Ammoniumpuffer

0.681 g einer 25%igen NH<sub>3</sub>-Lösung (10 mM NH<sub>3</sub>, Merck, reinst) wurden in ein Becherglas eingewogen, mit Reinstwasser auf ca. 950 ml aufgefüllt. Mit Hilfe einer pH-Elektrode wurde anschließend die Lösung mit 1 M HCl-Lösung auf pH 10 eingestellt. Diese wurde in einen 1 l Maßkolben überführt und aufgefüllt.

## 6.4 Synthesen

### 6.4.1 Homopolymerisation von fluorierten Acrylaten

Das Monomer wurde zunächst über eine Vigreux-Kolonne im Vakuum destilliert (Hauptfraktion bei 40 °C / 45 mbar). 6 g 2,2,2-Trifluorethylmethacrylat (TFEMA, ABCR,  $M = 168.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 36 mmol), 0.06 g Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN, 0.36 mmol), und 24 ml wasserfreies Dioxan wurden zusammen mit einem Magnetrührer in einen Schlenkkolben gebracht und durch drei „Einfrier – Vakuum – Auftau“ – Zyklen entgast. Anschließend erfolgte die Polymerisation unter permanentem Rühren für 24 h bei 65°C.

Die Aufarbeitung erfolgte durch Ausfällen in Hexan und anschließende Trocknung bei Raumtemperatur im Vakuum. Ausbeute: 80 % (4.8 g). Analog wurde die Synthese mit 6 g 3,3,3,2,2-Pentafluorpropylmethacrylat (PPFMA,  $M=218.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 27.5 mmol) durchgeführt. Ausbeute: 75 % (4.51 g).

### 6.4.2 Modifizierung von Perlcellulose mittels Cer(IV)-initiiertem Pfropfcopolymerisation

19.6 g gequollene Perlcellulose (ca. 6.5 g Trockensubstanz;  $M_{AGU}=162.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 40 mmol AGU) wurden zunächst zur Abtrennung des Stabilisators  $\text{NaN}_3$  in 100 ml VE Wasser dispergiert, nach 1 Stunde abfiltriert und mehrmals mit VE Wasser gewaschen.

**Tab. 6-2:** Pfropfung von Perlcellulose MT50 mit verschiedenen Fluoracrylaten durch Cer(IV)-Redox-Initiierung (Bedingungen:  $c_{AGU}=1 \text{ mol l}^{-1}$ ;  $c_{\text{Cer(IV)}}=0.01 \text{ mol l}^{-1}$ ;  $c_{\text{HNO}_3}=0.01 \text{ mol l}^{-1}$ ;  $T=40 \text{ °C}$ ) ;  $w_{100\%}$ : Pfropfanteil bei 100% Umsatz.

Produkt	Monomer	$c_{\text{Monomer}}$ [mol l <sup>-1</sup> ]	$w_{100\%}$ [%]
MT50-g-PTFEMA 2	TFEMA	1.00	51
MT50-g-PTFEMA 3	TFEMA	0.11	10
MT50-g-PTFEMA 4	TFEMA	0.20	17
MT50-g-PPFMA 1	PPFMA	0.20	21

Zur Perlcellulose wurden 25 ml VE-Wasser gegeben. Anschließend wurde 0.72 g TFEMA (4.3 mmol) zugegeben und für eine Stunde  $\text{N}_2$  eingeleitet. Die Reaktionsmischung wurde nun auf 40 °C erwärmt und mit 2 ml einer 0.2 n Cer(IV)ammoniumnitrat-Lösung versetzt. Für die Initiatorlösung wurden 1.096 g Cer(IV)ammoniumnitrat ( $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ ,  $M = 548.23 \text{ g mol}^{-1}$ ) in einen 10 ml Maßkolben eingewogen und mit 0.2 M  $\text{HNO}_3$  aufgefüllt.

Die Reaktionslösung wurde für vier Stunden bei 40 °C gerührt und anschließend mit 1 M NaOH neutralisiert. Anschließend wurde gegen Wasser dialysiert (regenerierte Cellulose, Leitfähigkeitskontrolle) und über einen Büchnertrichter abgesaugt. Ein Teil der Probe wurde mit Aceton extrahiert um eventl. vorhandenes Homopolymer zu bestimmen.

Die Synthese wurde analog mit 10 und 40 mmol TFEMA sowie 10 mmol PFPMA durchgeführt.

#### 6.4.3 *Polymeranaloge Umsetzung von Perlcellulose mit 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-5-iod-pentan*

Zur polymeranalogen Umsetzung wurde 5 g (31 mmol) der mittels Lösungsmittelaustausch getrockneten Perlcellulose MT50 eingesetzt. Diese wurde zusätzlich über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde Sie im 50 ml Zweihalskolben vorgelegt und mit 10 ml Acetonitril versetzt, so dass eine rührbare Suspension entstand. Die Suspension wurde unter Rühren und N<sub>2</sub>-Atmosphäre auf 80 °C erhitzt (im Rückfluss); anschließend wurde tropfenweise mit Hilfe einer Spritze 1.93 g 1,1,1,2,2,3,3-Heptafluor-1-iodpentan (HFIP, ~0.9 ml, 6.1 mmol, M=321.96 g mol) zugegeben. Zunächst wurde sieben Stunden diese Temperatur gehalten, danach über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt.

Die Perlen wurden im Filter zunächst mit Acetonitril, dann mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung und schließlich gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und über einen Büchnertrichter abgesaugt. Ausbeute: 12.7 g (Produkt HFP-MT50 1). Der Versuch wurde mit 1.22 g (3.8 mmol) HFIP wiederholt (Produkt HFP-MT50 2).

## 6.5 *Aggregationsuntersuchungen*

Für die Aggregationsuntersuchungen an Insulinlösungen (nach einer Methode von *Sluzky et al.* [105]), wurde zunächst eine Insulin-Stammlösung mit einer Konzentration von  $1 \text{ g l}^{-1}$  mit 10 mM HCl hergestellt (pH 2): Die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend über einen Spritzenvorsatzfilter (GHP Acrodisc  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ ) filtriert, um eventuell vorhandene ungelöste Anteile abzutrennen.

Zur Induzierung der Aggregation wurden anschließend jeweils 0.75 ml der Stammlösung in Probengläser pipettiert und bei 180 Oszillationen pro Minute in einem Trockenschrank bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt.

Neben reinen Insulinlösungen wurden jeweils Mischungen aus 0.75 ml Stammlösung und  $100 \pm 0.5 \text{ mg}$  feuchter (modifizierter) Cellulosepartikel eingesetzt.

Für zusätzliche Messreihen (jeweils ohne Cellulosepartikel) wurden die Insulin-Stammlösungen mit Mischungen aus 10 mM HCl-Lösung und 1 bzw. 10 Vol.-% 2,2,2-Trifluorethanol hergestellt.

## 6.6 *Übersicht über die analytischen Methoden*

### 6.6.1 *Lichtmikroskopie*

Gerät:	Olympus BX60
Kamera:	Sony Progressive 3CCD (mit Kamera Adapter CMA-D2)
Objektive:	UPlanFl 10x / 0.30; 20x / 0.50 und 40x / 0.75 (jeweils Univ. Planfluoriert)
Software:	analySIS 3.00

### 6.6.2 *Rasterelektronenmikroskopie*

Die REM-Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop im Labor VIII.23 der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) in Berlin durchgeführt.

Gerät:	Cambridge S180 mit energiedispersivem Röntgenspektrometer Roentec „MultiMax“
Anregungsspannung:	10 keV
Kippwinkel:	30 °
WD:	20 mm
Software:	ScanVision

### 6.6.3 *Helium-Pyknometrie*

Gerät:	He-Pyknometer Pycnomatic ATC der Fa. Porotec GmbH (Hofheim/Ts.)
Probenkammer:	Größe M (ca. 40.7 cm <sup>3</sup> )
Anzahl der Einzelmessungen je Probe:	40

### 6.6.4 *Quecksilberporosimetrie*

Niederdruckporosimeter PASCAL 140

Messbereich:	0.0007 bis 0.4 MPa
--------------	--------------------

Hochdruck-Messstation PASCAL 440

Messbereich:	0.4 bis 420 MPa
--------------	-----------------

Probenmengen:	0.5 g (MT50) bzw. 0.25 g (MT100)
---------------	----------------------------------

Stoffdaten:

Kontaktwinkel: 140°;

Hg-Oberflächenspannung: 0.48 N m<sup>-1</sup>;

Hg-Dichte: 13.5414 g ml<sup>-1</sup>

### 6.6.5 Gasadsorptionsmessungen

Gerät:	Gassorptionsapparatur ASAP 2010 der Fa. Micromeritics GmbH (Mönchengladbach) mit spezieller ASAP-Software
Trocknung der Probe:	21 h im Vakuum (~10 mbar)
Messgas:	N <sub>2</sub>
Bad-Temperatur:	77 K
Startdruck:	0.12 mbar
Messdauer:	ca. 16 h
Probenmengen:	ca. 0.75 g

### 6.6.6 Größenausschlusschromatographie (SEC)

a) *MALLS-SEC*

Geräte:

- Vierkanal-Entgaser, SCM 400 (Fa. Spectra Physics, Mountain View, CA, USA)
- Isokratische Pumpe, P 1000 (Fa. Spectra Physics)
- OPTILAB DSP Interferometric Refractometer (Fa. Wyatt)
- Autosampler, AS 1000 (Fa. Spectra Physics)
- UV/VIS-Detektor UV 2000 (Fa. Spectra Physics)
- Lichtstreuendetektor Dawn DSP (Fa. Wyatt, Santa Barbara, CA, USA)
- Viskositätsdetektor  $\eta$ -1002 (Fa. WGE Dr. Bures, Dallgow)

Trennsäulen: TSK-GEL<sup>®</sup> Säulen (Polyglycidylmethacrylat-Gel; Fa. TOSOH Bioscience; Montgomeryville/USA) Guard (7.5 × 75 mm)+ 6000 + 5000 + 3000 + 2000 (je 7.5 × 300 mm)

Laufmittel: Phosphatpuffer 0.01M pH 6.5 + 0.1M NaNO<sub>3</sub>

Flussrate: 1.0 ml·min<sup>-1</sup>

Injektionsvolumen: 100µl

Auswertesoftware: PSS WinSEC Unity (Fa. Polymer Standards, Mainz) und Astra 4.7 (Fa. Wyatt)

*b) Inverse SEC:*

Geräte:

- UV/Vis-Detektor 785A (Fa. Perkin Elmer; Waltham, MA, USA)
- RI-Detektor  $\Delta n$ -1000 (Wellenlänge 620nm; Fa. WGE Dr. Bures; Dallgow-Döberitz)
- Vakuum-Degaser (Fa. WGE Dr. Bures)
- Isokratische Pumpe Q-1001 (Fa. WGE Dr. Bures)
- Autosampler AS 1000 (Fa. Spectra Physics)

Säule: Eco-plus Glassäule (10 × 250 mm max.; Fa. KronLab; Sinsheim)  
mit höhenverstellbarem Stempel

Standardmaterialien: Pullulan ( $M_p = 180 - 1\,540\,000 \text{ g mol}^{-1}$ ; Fa. PSS)

Laufmittel: Phosphatpuffer 0.01M pH 6.5 + 0.1M NaNO<sub>3</sub>

Flussrate: 0.5 ml·min<sup>-1</sup>

Injektionsvolumen: 50 µl

Auswertesoftware PSS WinSEC Unity + PSS PoroCheck 2.0

*c) Insulin unter denaturierenden Bedingungen*

Geräte: siehe Inverse SEC

Trennsäulen: Hema Bio 100 + 40 Å (je 8.0 x 300 mm;  
(2-Hydroxyethyl)methacrylat-Gel; Fa. PSS)

Laufmittel: 2.5 M Essigsäure in entionisiertem Wasser + 25 % Acetonitril v/v

Flussrate: 0.5 ml·min<sup>-1</sup>

Injektionsvolumen: 50 µl

Auswertesoftware PSS WinSEC Unity

*6.6.7 IR-Spektroskopie*

Gerät: Bruker IFS66v FT-IR Spectrometer

Wellenlängenbereich: 7000 - 400 cm<sup>-1</sup>

Auflösung: 1 cm<sup>-1</sup>

Anzahl der Scans: 200

ATR-Einheit: Diamant-ATR vom Typ Golden Gate™ der Fa. Specac Inc.

Probe: KBr-Pressling (ca. 2 mg Probe auf 778 mg KBr)

Referenz: KBr-Pressling (800 mg)

*Kalibrierung:*

Voruntersuchungen erfolgten mit Hilfe einer ATR-Einheit. Die Quantifizierung der Proben wurde mit KBr-Presslingen durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit Mischungen aus Homopolymeren und Perlcellulose. Da sich diese auf Grund ihrer stark unterschiedlichen Hydrophilie bzw. Hydrophobie nicht homogen mischen lassen, wurde das Fluoropolymer in Aceton gelöst und eine definierte Menge der Lösung auf die Perlcellulose getropft. Nach der Trocknung im Vakuumtrockenschrank konnten daraus KBr-Presslinge hergestellt werden.

*6.6.8 Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (XPS)*

Gerät:	XPS Spektrometer SAGE 150 der Fa. SPECS GmbH (Berlin)
Anregung:	Nicht-monochromatisierte $MgK_{\alpha}$ -Strahlung
Messmodus:	CAE-mode (Constant Analyser Energy)
Druckbereich:	ca. $10^{-7}$ mbar
Auswertung:	geräteintegrierte Specs-Software

Das Übersichtsspektrum wurde jeweils einmal gescannt, die einzelnen Elemente mit je 5 Scans gemessen.

*6.6.9 Dynamische Lichtstreuung (DLS)*

Gerät:	High Performance Particle Sizer <i>HPPS ET</i> von Malvern Instruments
Messbereich:	0.6 nm – 6000 nm hydrodynamischer Durchmesser
Laser:	He-Ne; 3.0 mW; 633 nm
Detektor:	Avalanche-Fotodiode; QE >50 % bei 633 nm
Korrelatorspezifikation:	Mindestprobezeit 125 ns; 288 Kanäle; Symmetrische Normalisierung
Software:	Dispersion Technology Software 5.02 von Malvern Instruments Ltd.

*Externe Auswertung der Proben (bei sehr starker Aggregation):*

Bei einer Reihe von Proben lieferte die Auswertung mit der Malvern-Software nur unbefriedigende Ergebnisse. Für diese wurden die Korrelationsdaten extern (mit Hilfe von Origin 8.0) ausgewertet: Die gemessene Autokorrelationsfunktion 2. Ordnung  $g^2(t)$  wurden auf einen Startwert von Eins normiert und durch das Ziehen der Quadratwurzel in eine Autokorrelationsfunktion 1. Ordnung  $g^1(t)$  umgewandelt (vgl. Abb. 4-35). Die besten Ergebnisse der Kurvenanpassung wurden mit zwei monodispersen Exponentialfunktionen vom Typ



**Gl. 6-1** 
$$g^1(t) = \exp\left(-t/\tau_1\right)^{\beta_1} + \exp\left(-t/\tau_2\right)^{\beta_2}$$

erzielt. Mit den Werten für  $\tau_1$  bzw.  $\tau_2$  konnten anschließend die Diffusionskoeffizienten  $D_1$  bzw.  $D_2$  berechnet werden. Hier gilt  $D = 1/(\tau \cdot q^2)$ , wobei  $q$  den Streuvektor darstellt (Gl. 3-10). Unter den Messbedingungen besitzt dieser einen Wert von  $0.02636 \text{ nm}^{-1}$ , mit einer Laserwellenlänge von  $632.8 \text{ nm}$ , einem Brechungsindex des Lösungsmittels von  $1.33$  und einem Streuwinkel von  $173^\circ$ . Über die Stokes-Einstein-Gleichung kann schließlich der hydrodynamische Radius der Partikel bestimmt werden (Gl. 3-8).

Zum direkten Vergleich mehrerer Proben erfolgte zusätzlich die Anpassung mit jeweils einer gestreckten Exponentialfunktion vom Typ  $g^1(t) = \exp\left(-t/\tau\right)^\beta$ . Die Kurven wurden hierzu jeweils nur für die Korrelationszeit zwischen  $0$  und  $1000 \mu\text{s}$  angepasst. Die weitere Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

#### 6.6.10 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Gerät:	SAXSess der Fa. Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Röntgenquelle:	Feststehende LFF-Röhre (Wellenlänge = $0.1542 \text{ nm}$ )
Röntgenoptik:	Fokussierende Optik (graded multilayer); Kollimationssystem für Strich- und Punktkollimation
Messzellen:	Durchflusszelle (Insulinaggregate)
Detektor:	CCD Detektor (Pixelgröße $24 \times 24 \mu\text{m}$ )
Messbereich ( $q$ ):	$0.04 - 7 \text{ nm}^{-1}$

## 7 Literatur

- 
- [1] Štamberg J. Bead Cellulose. Separation & Purification Reviews. 1988;17(2):155 - 83.
  - [2] Gemeiner P, Polakovic M, Mislovicova D, Stefuca V. Cellulose as a (bio)affinity carrier: properties, design and applications. Journal of Chromatography B. 1998;715(1):245-271
  - [3] Loth F, Fanter C. Perlförmige Celluloseprodukte und ihre Anwendung als Trenn- und Trägermaterial. Das Papier. 1993;47(12):703-710.
  - [4] Boeden HF, Pommerening K, Becker M, Rupprich C, Holtzhauer M, Loth F, et al. Bead cellulose derivatives as supports for immobilization and chromatographic purification of proteins. Journal of Chromatography A. 1991;552:389-414.
  - [5] Kagotani M, inventor; JP 62,277,401; ref.: C.A. 108, 114533. 1988
  - [6] Šėrys A, Liesienė J, Urbonavičienė J, Maruška A, Radzevičius K, Valatkevičiūtė D. Preparation and Characterization of Cellulose Based Adsorbents for Large Scale Hydrophobic Interaction Chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 1994;17(4):749 - 60.
  - [7] Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PTM, Zagorski MG. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid [beta]-peptides of Alzheimer's disease : Analysis of circular dichroism spectra. Journal of Molecular Biology. 1992;225(4):1075-93.
  - [8] Zhang H, Kaneko K, Nguyen JT, Livshits TL, Baldwin MA, Cohen FE, et al. Conformational transformations in peptides containing two putative [alpha]-helices of the prion protein. Journal of Molecular Biology. 1995;250(4):514-26.
  - [9] Vieira EP, Hermel H, Möhwald H. Change and stabilization of the amyloid-[beta](1-40) secondary structure by fluorocompounds. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics. 2003;1645(1):6-14.
  - [10] Murali J, Jayakumar R. Spectroscopic studies on native and protofibrillar insulin. Journal of Structural Biology. 2005;150(2):180-9.
  - [11] Rocha S, Thünemann AF, Pereira MC, Coelho MAN, Möhwald H, Brezesinski G. The Conformation of B18 Peptide in the Presence of Fluorinated and Alkylated Nanoparticles. ChemBioChem. 2005;6(2):280-3.
  - [12] Jakubke HD, Jeschkeit H. *Aminosäuren, Peptide, Proteine*. Weinheim, Deerfield Beach, Basel: Verlag Chemie 1982.

- 
- [13] Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;289(1-2):1-30.
- [14] Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*. 2003;81(11):678-99.
- [15] Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*. 1998;3(1):R9-R23.
- [16] Calamai M, Taddei N, Stefani M, Ramponi G, Chiti F. Relative Influence of Hydrophobicity and Net Charge in the Aggregation of Two Homologous Proteins. *Biochemistry*. 2003;42(51):15078-83.
- [17] Sunde M, Blake CCF. From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1998;31(01):1-39.
- [18] Cromwell M, Hilario E, Jacobson F. Protein Aggregation and Bioprocessing. *AAPS Journal*. 2006;8(3):E572-E579.
- [19] Fernandez A. What factor drives the fibrillogenic association of [beta]-sheets? *FEBS Letters*. 2005;579(29):6635-40.
- [20] Coelho MAN, Vieira EP, Motschmann H, Möhwald H, Thünemann AF. Human Serum Albumin on Fluorinated Surfaces. *Langmuir*. 2003;19(18):7544-50.
- [21] Meienhofer J, Schnable E, Bremer H, Brinkhoff O, Zabel R, Sroka W. Synthese der Insulinketten und ihre Kombination zu insulinaktiven Präparaten. *Zeitung für Naturforschung*. 1963;18b:1120-31.
- [22] Dische FE, Wernstedt C, Westermarck GT, Westermarck P, Pepys MB, Rennie JA, et al. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia*. 1988;31(3):158-61.
- [23] Nielsen L, Frokjaer S, Carpenter J, Brange J. Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;90(1):29-37.
- [24] Brange J, Andersen L, Laursen ED, Meyn G, Rasmussen E. Toward understanding insulin fibrillation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(5):517-25.
- [25] Whittingham JL, Scott DJ, Chance K, Wilson A, Finch J, Brange J. Insulin at pH 2: Structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *Journal of Molecular Biology*. 2002;318(2):479-90.

- 
- [26] Smith GD, Pangborn WA, Blessing RH. The structure of T6 bovine insulin. *Acta Crystallographica Section D*. 2005;61(11):1476-82.
- [27] Vestergaard B, Groenning M, Roessle M, Kastrup JS, van de Weert M, Flink JM, et al. A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils. *PLoS Biology*. 2007 May 01, 2007;5(5):e134.
- [28] Jimenez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 July 9, 2002;99(14):9196-201.
- [29] Ahmad A, Millett IS, Doniach S, Uversky VN, Fink AL. Partially folded intermediates in insulin fibrillation. *Biochemistry*. 2003;42(39):11404-16.
- [30] O'Neill IL, Reichardt E, inventors; Method of Producing Cellulose Pellets. United States patent 2,543,928. 1951 Mar.6.
- [31] Stamberg J, Peska J, Paul D, Philipp B. Perlcellulose - ein neuer makroporöser Träger für Ionenaustauscher und analoge Systeme. *Acta Polymerica*. 1979;30(12):734-9.
- [32] Peška J, Štamberg J, Blace Z, inventors; Method for manufacturing of spherical cellulose particles. United States patent 4,055,510. 1977 Oct.25.
- [33] Loth F, Fanter C, inventors; Bead-shaped cellulose products for separating and carrier materials and their manufacture. United States patent 5,527,902. 1996 Jun.18.
- [34] Maruska A, Liesiene J, Serys A, inventors; The method for preparing granulated cellulose. Lithuanian patent 2299. 1993.
- [35] Wolf B, Horsch W, Finke I. Einsatz der Perlcellulose zur kontrollierten Arzneistoff-Freigabe. *Pharmazie*. 1991;46:788-92.
- [36] Determann H, Rehner H, Wieland T, Meyer N, Wente F. Ein perlförmiges Cellulosegel für die Chromatographie. *Die Makromolekulare Chemie*. 1968;114(1):263-74.
- [37] Determann H, Wieland T, inventors; Gel Filtration Process. United States patent 3,597,350. 1971 Aug.3.
- [38] Peška J, Štamberg J, Blace Z, inventors; CS 172,640; ref.: C.A. 84, 91 889. 1976
- [39] Peška J, Štamberg J, Pelzbauer Z. Regenerated cellulose in the bead form. Aftertreatments and their effects on the porous structure of cellulose. *Cellulose Chemistry And Technology*. 1978;12:419-28.

- [40] Stamberg J, Peska J. Preparation of porous spherical cellulose. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*. 1983;1(2):145-7.
- [41] Motozato Y, Ishibashi H, inventors; EP 25,639; ref. C.A. 95, 26865. 1981
- [42] Motozato Y, Matsumoto K, Hirayama C. *Nippon Kagaku Kaishi*. 1984;5:722
- [43] Kagotani M, Kyose A, inventors. JP 62 253 601; ref.: C.A. 108, 58205. 1988
- [44] Beneš M, Musil V, Tokar O, inventors; CS 212,131; ref.: C.A. 101, 173348. 1984
- [45] Motozato Y, inventor; JP 7,886,749; ref.: C.A. 89, 217 041. 1978
- [46] Peska J, Stamberg J, Hradil J, Ilavsky M. Cellulose in bead form: Properties related to chromatographic uses. *Journal of Chromatography A*. 1976;125(3):455-69.
- [47] Kuga S. New cellulose gel for chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1980;195(2):221-30.
- [48] O'Connell DW, Birkinshaw C, O'Dwyer TF. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*. 2008;99(15):6709-24.
- [49] Mishra MK, Graft copolymerization of vinyl monomers onto cellulose and cellulosic materials. *JMD – Rev. Macromol. Phys.*. 1983;C22(3):471-83.
- [50] Gupta KC, Khandekar K. Graft copolymerization of acrylamide-methylacrylate comonomers onto cellulose using ceric ammonium nitrate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002;86(10):2631-42.
- [51] Lechner MD, Gehrke K, Nordmeier EH, *Makromolekulare Chemie*. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag 1993
- [52] Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W. *Comprehensive Cellulose Chemistry Volume 2 – Functionalization of Cellulose*. Weinheim New York: Wiley-VCH 1998.
- [53] Houben-Weyl. *Methoden der organischen Chemie*. Band 14/2. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1963.
- [54] Arndt K-F, Müller G. *Polymer Charakterisierung*. München, Wien: Carl Hanser Verlag 1996.
- [55] Grubisic Z, Rempp P, Benoit H. A universal calibration for gel permeation chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*. 1967;5(9):753-9.
- [56] Elias HG. *Makromoleküle Band 2: Physikalische Strukturen und Eigenschaften*. Weinheim: Wiley-VCH 2001.

- [57] Dondos A. Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins. *Journal of Chromatography A*. 2006;1127(1-2): 183-6.
- [58] International Standard ISO13321: Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy. International Organisation for Standardisation (ISO) 1996
- [59] McNaught AD, Wilkinson A, Editors. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications 1997.
- [60] Meyer K, Lorenz P, Röhl-Kuhn B, Klobes P. Porous solids and their characterization. *Crystal Research and Technology*. 1994;29(7):903-30
- [61] Ritter HL, Drake LC. Pressure Porosimeter and Determination of Complete Macropore-Size Distributions. *Pressure Porosimeter and Determination of Complete Macropore-Size Distributions*. Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition. 1945;17(12):782-6.
- [62] Ritter HL, Drake LC. Pore size distribution in porous materials. Macropore size distributions in some typical porous substances. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*. 1945;17(12):787-91.
- [63] DIN-Norm 66133: Bestimmung der Porengrößenverteilung und der Spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Quecksilberintrusion. Berlin: Beuth Verlag 1993
- [64] Washburn EW. The Dynamics of Capillary Flow. *Physical Review*. 1921;17(3):273-83.
- [65] Rootare HM, Prenzlöw CF. Surface areas from mercury porosimeter measurements. *Journal of Physical Chemistry*. 1967;71(8):2733-6.
- [66] Sing KSW. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*. 1985;57(4):603-19.
- [67] DIN 66134: Bestimmung der Porengrößenverteilung und der Spezifischen Oberfläche mesoporöser Feststoffe durch Stickstoffsorption. Berlin: Beuth Verlag 1998.
- [68] de Boer JH, Lippens BC, Linsen BG, Broekhoff JCP, van den Heuvel A, Osinga TJ. Thet-curve of multimolecular N<sub>2</sub>-adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1966;21(4):405-14.
- [69] Halsey G. Physical Adsorption on Non-Uniform Surfaces. *The Journal of Chemical Physics*. 1948;16(10):931-7.

- 
- [70] Dauwe C, Marmè S. Qualitätssicherung mit inverser GPC. GIT Labor-Fachzeitschrift. 2001;11/2001:1220-4.
- [71] Gorbunov AA, Solovyova LY, Pasechnik VA. Fundamentals of the theory and practice of polymer gel-permeation chromatography as a method of chromatographic porosimetry. Journal of Chromatography A. 1988;448:307-32.
- [72] Casassa EF. Equilibrium distribution of flexible polymer chains between a macroscopic solution phase and small voids. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters. 1967;5(9):773-8.
- [73] Casassa EF, Tagami Y. An Equilibrium Theory for Exclusion Chromatography of Branched and Linear Polymer Chains. Macromolecules. 1969;2(1):14-26.
- [74] Casassa EF. Comments on Exclusion of Polymer Chains from Small Pores and Its Relation to Gel Permeation Chromatography. Macromolecules. 1976;9(1):182-5.
- [75] Porod G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung Von Dichtgepackten Kolloiden Systemen. 1. Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Für Polymere. 1951;124(2):83-114.
- [76] Porod G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung Von Dichtgepackten Kolloiden Systemen .2. Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere. 1952;125(1):51-57.
- [77] Smarsly B, Antonietti M, Wolff T. Evaluation of the small-angle x-ray scattering of carbons using parametrization methods. Journal of Chemical Physics. 2002;116(6):2618-2627.
- [78] Stribeck N, Ruland W. Determination of Interface Distribution Function of Lamellar 2-Phase Systems. Journal of Applied Crystallography. 1978;11:535-539.
- [79] ISO The International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology. First Editon 1984, Last Revision 1993, Genève: International Organisation for Standardisation
- [80] de la Torre JG, Huertas ML, Carrasco B. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. Biophysical Journal. 2000 February 1, 2000;78(2):719-30.
- [81] Southerland WM, Winge DR, Rajagopalan KV. The domains of rat liver sulfite oxidase. Proteolytic separation and characterization. Journal of Biological Chemistry. 1978 December 25, 1978;253(24):8747-52.
- [82] Hess EL, Cobure A. The Intrinsic Viscosity of Mixed Protein Systems, Including Studies of Plasma and Serum. The Journal of General Physiology. 1950 May 20, 1950;33(5):511-23.

- 
- [83] DePhillips P, Lenhoff AM. Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000;883(1-2):39-54.
- [84] Sturges HA. The Choice of a Class Interval. *Journal of The American Statistical Association*. 1926;21:65-6.
- [85] Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*. 1951;73(1):373-80.
- [86] Gregg SJ, Sing KSW. *Adsorption, surface area and porosity – 2<sup>nd</sup> edition*. London: Academic Press 1982.
- [87] Dubin PL, Edwards SL, Mehta MS, Tomalia D. Quantitation of non-ideal behavior in protein size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1993; 635(1):51-60.
- [88] Kato T, Katsuki T, Takahashi A. Static and dynamic solution properties of pullulan in a dilute solution. *Macromolecules*. 1984;17(9):1726-30.
- [89] Potschka M. Universal calibration of gel permeation chromatography and determination of molecular shape in solution. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162(1):47-64.
- [90] Yao Y, Lenhoff AM. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1037:273–282
- [91] Hagel L, Ostberg M, Andersson T. Apparent pore size distributions of chromatography media. *Journal of Chromatography A*. 1996;743(1):33-42.
- [92] Casassa EF. Theoretical models for peak migration in gel permeation chromatography. *Journal of Physical Chemistry*. 1971;75(26):3929-39.
- [93] Glatter O. Determination of Particle-Size Distribution-Functions from Small-Angle Scattering Data by Means of the Indirect Transformation Method. *Journal of Applied Crystallography*. 1980;13:7-11.
- [94] Porod G. Small-Angle Scattering of X-rays. In: Brumberger H, editor. New York, London, Paris: Gordon & Bleach; 1967.
- [95] Gupta KC, Sahoo S. Grafting of acrylonitrile and methyl methacrylate from their binary mixtures on cellulose using ceric ions. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;79(5):767-78.



- [96] Kondo T, Kubota H, Katakai R. Effect of ultrasonic irradiation on ceric-salt-initiated grafting of methyl methacrylate onto regenerated cellulose film. *Journal of Applied Polymer Science*. 1999;71(2):251-8.
- [97] Flaqué C, Rodrigo LC, Ribes-Greus A. Biodegradation studies of cellulose and its vinylic graft copolymers by thermal analysis and mechanical spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000;76(3):326-35.
- [98] Hee JC, Lee SJ, Sohk WK. Characterization of Surface of Polyvinylalcohol-graft-poly (2,2,2-trifluoroethyl methacrylate) Copolymer. *Journal of the Korean Chemical Society*. 1992;36(1):131-6.
- [99] Chiantore O, Lazzari M, Aglietto M, Castelvetro V, Ciardelli F. Photochemical stability of partially fluorinated acrylic protective coatings I. Poly(2,2,2-trifluoroethyl methacrylate) and poly(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl methacrylate-co-2-ethylhexyl methacrylate)s. *Polymer Degradation and Stability*. 2000;67(3):461-7.
- [100] DIN-Norm 32645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Berlin: Beuth Verlag 1994.
- [101] DIN-Norm 38402, Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren. Berlin: Beuth Verlag 1986.
- [102] Watts JF, Wolstenholme J. *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES*. Chichester New York: John Wiley & Sons Ltd 2003.
- [103] Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentals of Analytical Chemistry – 8<sup>th</sup> Edition*. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Pub. Co. 2004.
- [104] Fras L, Laine J, Stenius P, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V, Dolecek V. Determination of dissociable groups in natural and regenerated cellulose fibers by different titration methods. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004; 92(5):3186-95.
- [105] Sluzky V, Tamada JA, Klibanov AM, Langer R. Kinetics of Insulin Aggregation in Aqueous Solutions upon Agitation in the Presence of Hydrophobic Surfaces. *PNAS*. 1991 November 1, 1991;88(21):9377-81.
- [106] Tokumoto S, Higo N, Sugibayashi K. Effect of electroporation and pH on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;326(1-2):13-9.
- [107] Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, et al. Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism. *Biochemistry*. 2001;40(20):6036-46.

- 
- [108] Uversky VN, Nielsen Garriques L, Millett IS, Frokjaer S, Brange J, Doniach S, et al. Prediction of the association state of insulin using spectral parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;92(4):847-58.
- [109] Kubowicz S, Thünemann AF, Weberskirch R, Möhwald H. Cylindrical Micelles of alpha-Fluorocarbon-omega-hydrocarbon End-Capped Poly(N-acylethylene Imine)s. *Langmuir*. 2005;21(16):7214-9.
- [110] Miller AF. Gelation of Misfolded Proteins. *Macromolecular Symposia*. 2005; 222(1):109-14.
- [111] Kaltofen, RE. *Tabellenbuch Chemie*. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie 1982.